

Aus dem Medizinischen Zentrum für Hygiene und  
Medizinische Mikrobiologie mit Medizinal-Untersuchungsamt  
der Philipps-Universität Marburg  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. H.-D. Klenk  
Institut für Virologie  
Leiter: Prof. Dr. H.-D. Klenk

**Hemmstudien von rekombinant exprimiertem und  
gereinigtem *Spodoptera frugiperda* Furin  
mittels Peptidinhibitoren –  
Struktur- und Inhibitionseigenschaften  
der SFurin-Prodomäne**

**Dissertation**

zur  
Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem  
Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Hanno Scheffczik**

aus Eschwege

Marburg/Lahn, 2002

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg  
als Dissertation am ..... angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. H. Kindl

Zweitgutachter: Prof. Dr. W. Garten

Tag der Disputation .....

## ZUM GEDENKEN AN DIE OPFER VON TERROR UND KRIEG

Von guten Mächten treu und still umgeben,  
behütet und getröstet wunderbar,  
so will ich diese Tage mit euch leben  
und mit euch gehen in ein neues Jahr.

Noch will das alte unsre Herzen quälen,  
noch drückt uns böser Tage schwere Last,  
ach, Herr, gib unsern aufgeschreckten Seelen  
das Heil, für das Du uns geschaffen hast.

Und reichst Du uns den schweren Kelch, den bittern  
des Leids, gefüllt bis an den höchsten Rand,  
so nehmen wir ihn dankbar ohne Zittern  
aus Deiner guten und geliebten Hand.

Doch willst Du uns noch einmal Freude schenken  
an dieser Welt und ihrer Sonne Glanz,  
dann wolln wir des Vergangenen gedenken,  
und dann gehört Dir unser Leben ganz.

Laß warm und hell die Kerzen heute flammen,  
die Du in unsre Dunkelheit gebracht,  
führ, wenn es sein kann, wieder uns zusammen.  
Wir wissen es, Dein Licht scheint in der Nacht.

Wenn sich die Stille nun tief um uns breitet,  
so laß uns hören jenen vollen Klang  
der Welt, die unsichtbar sich um uns weitet,  
all Deiner Kinder hohen Lobgesang.

Von guten Mächten wunderbar geborgen,  
erwarten wir getrost, was kommen mag.  
Gott ist bei uns am Abend und am Morgen  
Und ganz gewiß an jedem neuen Tag.

DIETRICH BONHOEFFER

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Allgemeine Einführung .....	1
1.2 Die Familie der eukaryontischen subtilisinähnlichen Endoproteasen .....	2
1.3 Furin .....	5
1.3.1 Der Reifungsweg von Furin .....	6
1.3.2 Der subzelluläre Transport und die Lokalisation von Furin .....	6
1.3.3 Zelluläre, bakterielle und virale Substrate von Furin.....	7
1.3.4 Furin Inhibitoren .....	8
1.3.5 Aufbau und Eigenschaften von <i>Spodoptera frugiperda</i> Furin.....	9
1.4 Aufgabenstellung und Ziel der Arbeit.....	11
 <b>2 Material .....</b>	 <b>12</b>
2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial .....	12
2.2 Enzyme.....	14
2.3 Oligonukleotide.....	15
2.4 Vektoren und Matrizen .....	16
2.5 Bakterienstämme und Zelllinien .....	17
2.5.1 Bakterienstämme .....	17
2.5.2 Zelllinien .....	17
2.6 Kits .....	18
2.7 Nährmedien und Puffer für Bakterien- und Zellkultur.....	18
2.8 Puffer für Elektrophorese und Elektroblothing.....	20
2.9 Puffer für Proteinexpression, Reinigung und Enzymaktivitätstest .....	21
2.10 Sythetische Peptide .....	22
2.11 Geräte und Systeme.....	23
2.12 Chromatographiesäulen.....	23

<b>3 Methoden.....</b>	<b>24</b>
3.1 Klonierungstechniken .....	24
3.1.1 Reinigung von Oligonukleotiden .....	24
3.1.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren .....	24
3.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	24
3.1.4 Reinigung von PCR-Fragmenten .....	26
3.1.5 Restriktionsverdau von dsDNA .....	26
3.1.6 Phosphatasebehandlung linearisierter Plasmide .....	27
3.1.7 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel .....	27
3.1.8 Extraktion von DNA aus Agarosegelen .....	27
3.1.9 Ligation von Insert-DNA mit linearisierter Vektor-DNA .....	28
3.1.10 Übernachtskulturen und Stammkulturen .....	28
3.1.11 Transformation von DNA in kompetente <i>E. coli</i> -Bakterien .....	29
3.1.12 Plasmid-DNA-Isolierung .....	29
3.1.13 Enzymatische Sequenzierung von DNA .....	30
3.1.14 Subklonierung in den Vektor pCR 2.1 .....	31
3.2 Bakterielle Proteinexpression.....	32
3.2.1 Präparation der bakteriellen Lysate: Anzucht, Induktion, Ernte und Lyse der Bakterienkultur.....	33
3.2.2 Affinitätsreinigung des MBP-Fusionsproteins mittels Amylose-Harz .....	33
3.2.3 Proteolytische Spaltung des Fusionsproteins mittels Faktor Xa .....	33
3.3 Ankonzentrieren und Umpuffern von Proteinlösungen .....	34
3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	34
3.4.1 Kolorimetrische Methode.....	34
3.4.2 Messung der UV-Absorption .....	35
3.5 Präparative Proteinreinigung mittels FPLC ( <i>Fast-Protein Liquid Chromatography</i> ) .....	35
3.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	36
3.7 Elektrophoretische Transfer (Western Blotting).....	37
3.8 Nachweis Biotin-markierter Proteine auf Nitrocellulosemembran.....	37
3.9 Aufbewahren von Proteinlösungen .....	38
3.10 Zellkultur – Kultivierung von Insektenzellen .....	38
3.11 Proteinexpression in Insektenzellen mittels rekombinanter Baculoviren .....	38
3.11.1 Prinzip des BAC-TO-BAC™ Baculovirus Expressionssystems .....	38

3.11.2 Sequenzspezifische Transposition zur Erzeugung rekombinanter Bacmid-DNA	40
3.11.3 Transfektion rekombinanter Bacmid-DNA	40
3.11.4 Herstellen von hochtitrigen Virusstammlösungen	41
3.11.5 Plaquetest zur Bestimmung des Virustiters	41
3.11.6 Infektion von Insektenzellen: Rekombinante eukaryontische Proteinexpression	42
3.11.7 Lyse von Insektenzellen	42
3.12 Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung	43
3.13 Enzymaktivitäts-Test	43
3.13.1 Furin-Aktivitätsmessungen ohne Inhibitor	44
3.13.2 Furin-Aktivitätsmessungen mit Inhibitor	45
3.14 Kristallisation von Proteinen	45
3.14.1 Proteinkristalle	45
3.14.2 Kristallisation aus übersättigten Lösungen	46
3.14.3 Proteinkristallisation durch Gasphasendiffusion, die Methode „hanging drop“	46
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>48</b>
4.1 Klonierung, Expression und Reinigung von katalytisch aktivem SFurin	48
4.1.1 Klonierung der katalytischen Domäne von SFurin in den Vektor pFASTBAC1	48
4.1.2 Herstellung rekombinanter Baculoviren	50
4.1.3 Expression von katalytisch aktivem SFurin mit Hilfe des BAC-TO-BAC™ Baculovirus Expressionssystems	50
4.1.3.1 Enzymaktivität des Zellysats und des Zellkulturüberstands von Baculo-SFurin infizierten Sf9-Zellen	51
4.1.3.2 Vergleich der Enzymaktivität von Baculo-Wildtyp Virus infizierten Sf9-Zellen zu Baculo-SFurin Virus infizierten Sf9- und High-Five™ Zellen	52
4.1.4 Proteinexpression und präparative Reinigung von katalytisch aktivem SFurin	53
4.1.4.1 Etablierung der Reinigung von katalytisch aktivem SFurin mittels flüssigkeitschromatographischer Trennmethoden	54
4.1.4.2 Entsalzen und Umpuffern der Proteinlösungen nach (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Fällung	56
4.1.4.3 Ionenaustauschchromatographie der entsalzten Proteinlösungen	57
4.1.4.4 Ausschlußchromatographie der entsalzten Proben nach Ionenaustausch- chromatographie	59
4.1.5 Reinheit und Identität des gereinigten, katalytisch aktiven SFurins	61

4.2 Enzymatische Charakterisierung des katalytisch aktiven SFurins.....	62
4.2.1 Michaelis-Menten Enzymkinetik .....	62
4.2.2 Untersuchung der Thermostabilität.....	65
4.3 Klonierung, Expression, Reinigung und Kristallisation der Prodomäne von <i>Spodoptera frugiperda</i> Furin.....	66
4.3.1 Klonierung der Prodomäne von SFurin in den Vektor pMAL-c2 .....	66
4.3.2 Expression der Prodomäne von SFurin.....	67
4.3.3 Reinigung der SFurin Prodomäne mittels Ionenaustauschchromatographie .....	68
4.3.4 Kristallisation der Prodomäne von <i>Spodoptera frugiperda</i> Furin.....	70
4.4 Inhibitionsstudien.....	71
4.4.1 Wirkungsweise der eingesetzten Peptid-Inhibitoren.....	71
4.4.2 Übersicht der eingesetzten Peptid-Inhibitoren .....	72
4.4.3 Ziel der Inhibitionsstudien und Versuchsbedingungen.....	73
4.4.4 Dixon-Plots der potentiellen Furin-Peptidinhibitoren.....	74
4.4.5 Dixon-Plot der bakteriell exprimierten und gereinigten SFurin-Prodomäne.....	80
4.4.6 Zusammenfassung und Übersicht der gemessenen Hemmkonstanten.....	80
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>82</b>
5.1 Expression und Reinigung von katalytisch aktivem SFurin .....	82
5.2 Kinetische Charakterisierung von SFurin .....	83
5.3 Hemmstudien von SFurin mittels zahlreicher Peptidinhibitoren .....	84
5.3.1 Struktur der katalytischen Domäne von Furin .....	84
5.3.2 Hemmung von SFurin mittels nicht kompetitiver Peptidinhibitoren .....	87
5.3.3 Hemmung von SFurin mittels kompetitiver Peptidinhibitoren .....	87
5.3.4 Inhibition von SFurin mit der bakteriell exprimierten und gereinigten SFurin- Prodomäne.....	90
5.3.5 Vergleich der Hemmkonstanten.....	91
5.4 Kristallisation der Prodomäne von SFurin – Bedeutung der dreidimensionalen Struktur der Domäne .....	92

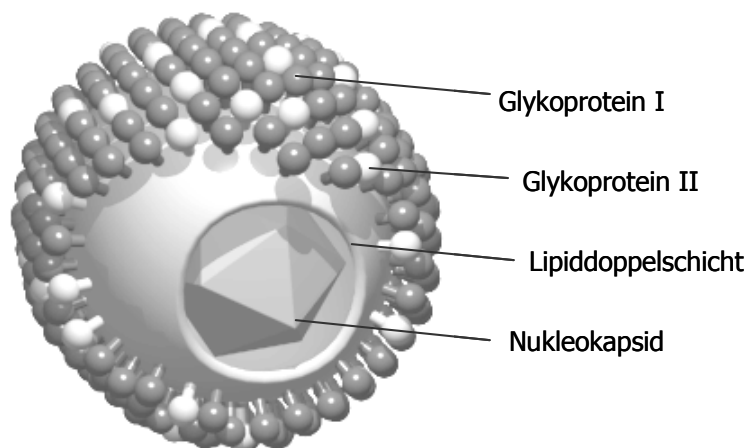
<b>6 Zusammenfassung .....</b>	<b>95</b>
<b>7 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>96</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>107</b>
Abkürzungsverzeichnis .....	107
Abkürzungen der verwendeten Größenordnungen .....	109
Ein- und Dreibuchstaben-Code für Aminosäuren .....	109
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....	110
<i>Spodoptera frugiperda</i> Furin Aminosäure-Sequenz .....	113
<i>Spodoptera frugiperda</i> Furin cDNA Basensequenz .....	114
pBluescript SK/sfur 93-6385 ( <i>Klon 5</i> ) - Ausschnitte aus der Basensequenz .....	116
Übersicht: Anreicherung der SFurin-Aktivität .....	117
 <b>Präsentation von Arbeitsergebnissen auf Tagungen .....</b>	 <b>118</b>
<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>119</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>120</b>
<b>Erklärung .....</b>	<b>121</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Allgemeine Einführung

Viren sind selbstreproduzierende obligat intrazelluläre Parasiten. Das Genom infektiöser Viruspartikel (*Virionen*) besteht aus Desoxyribonukleinsäure (*DNA*) oder Ribonukleinsäure (*RNA*) und ist von einer schützenden Hülle aus Proteinen, dem Kapsid, umgeben. Die Kapside vieler Viren sind von einer Lipiddoppelschicht umhüllt, die je nach dem Ort der Virusassoziation (*Assembly*) in der Zelle intrazellulären Membranen oder der Plasmamembran entstammt. In ihr sind virale Membranglykoproteine eingelagert, die für das Eindringen des Virus in die Zelle, d. h. für die Bindung des Virus an zelluläre Rezeptoren und die daran anschließende Fusion der Virusmembran mit der zellulären Membran der Wirtszelle notwendig sind. Ebenso sind sie an der Virusfreisetzung, dem Abknospen (*Budding*) neuer infektiöser Partikel beteiligt. Die Membranglykoproteine sind auf der Virusoberfläche deutlich exponiert und mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen als sog. „Spikes“ zu erkennen (Abb. 1).



**Abb. 1: Schematische Darstellung eines umhüllten Virus.** Das dargestellte Virus trägt zwei verschiedene Membranglykoproteine in der Lipiddoppelschicht, die das Nukleokapsid umgibt (3D-Darstellung mit freundlicher Genehmigung von Dr. Markus Eickmann, Internet: [biografix.de](http://biografix.de)).

Virale Glykoproteine werden wie zelleigene membranständige Glykoproteine im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums synthetisiert und auf dem konstitutiv sekretorischen Weg über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran transportiert. Auf diesem Weg unterliegen Glykoproteine zahlreichen ko- und posttranslationalen Modifikationen, wie der Abspaltung

von Signalsequenzen, Glykosylierung, Acylierung oder proteolytischer Spaltung. Die endoproteolytische Spaltung viraler Glykoproteine erfolgt in der Regel im Golgi-Apparat. Dort werden die biologisch inaktiven Vorläufermoleküle in fusionsaktive Glykoproteine überführt. Freigesetzte Virusnachkommen sind jetzt in der Lage, weitere Wirtszellen zu infizieren und einen neuen Replikationszyklus zu durchlaufen.

Zelleigene, subtilisinähnliche Endoproteasen wurden als Aktivierungsproteasen gefunden. Furin, die zuerst identifizierte Proproteinkonvertase dieser Familie, gilt als das Schlüsselenzym für die proteolytische Aktivierung viraler Glykoproteine. Spezifische Furininhibitoren, insbesondere substratanaloge Peptide, stellen potentielle antivirale Therapeutika für eine Vielzahl von viralen Infekten dar.

## **1.2 Die Familie der eukaryontischen subtilisinähnlichen Endoproteasen**

In eukaryontischen Zellen werden proteolytisch aktive Sekret- und Membranproteine des konstitutiven und regulierten Sekretionswegs meist als biologisch inaktive Vorläuferproteine (*Proenzyme*, *Zymogene*) synthetisiert. Dies dient, neben dem Schutz der Proteine vor frühzeitigem proteolytischem Abbau, vorallem der Regulation der spezifischen proteolytischen Aktivität. Die proteolytische Spaltung der Vorläuferproteine, d. h. das Abspalten eines Propeptids überführt das Protein in seine katalytisch aktive Form.

Proteine des regulierten Sekretionswegs, wie Proteo- und Peptidhormone, die von endokrinen und neuroendokrinen Zellen sezerniert werden, liegen anfänglich meist als Präprohormone vor. Bereits im ER wird ihre Signalsequenz kotranslational abgespalten. Das entstandene Prohormon wird zum *trans*-Golgi-Netzwerk (*TGN*) transportiert und in Vesikeln gespeichert. Dort findet die Abspaltung des Propeptids C-terminal der dibasischen Sequenzen R-R oder K-R statt, wodurch das Hormon aktiviert wird. Vorläuferproteine des konstitutiven Sekretionswegs hingegen besitzen meistens eine andere Spaltsequenz. Sekret- und Membranproteine werden durch die Spaltung C-terminal des mehrbasigen Motivs R-X-K/R-R aktiviert (zur Übersicht: Barr et al., 1991; Hosaka et al., 1991).

Die erste Protease zur Aktivierung von Vorläuferproteinen wurde 1989 mit der Kex2p-Protease (*yKexin*; EC 3.4.21.61) in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gefunden, die den  $\alpha$ -Faktor und das Killertoxin der Hefe durch proteolytische Spaltung nach einem dibasischen Motiv R-R oder K-R, selten auch nach P-R aktiviert (Fuller et al., 1989; Zhu et al. 1992). Auch konnte gezeigt werden, daß in Säugerzellen exprimiertes Kexin in der Lage ist, ein

neuroendokrines Prohormon (*Präpro-Opiomelanocortin, mPOMC*) zu spalten (Thomas et al., 1988). Durch Sequenzvergleiche mit humanen Genomabschnitten wurde aufgrund auffälliger Homologien zum *Kex2p*-Gen das *fur*-Gen identifiziert (Fuller et al., 1989), das stromaufwärts des humanen *fes/fps*-Protoonkogens gefunden wurde (*fur: fes/fps upstream region*). Das abgeleitete Genprodukt bekam den Namen Furin (Roebroek et al., 1986). Es wurde auch als PACE (Barr et al., 1991) oder SPC1 bezeichnet (*PACE: paired basic-aminoacid cleaving enzyme; SPC1: subtilisin-like proprotein convertase 1; EC 3.4.21.85*). Nach der Entdeckung von Furin gelang es in höheren Eukaryonten eine Vielzahl von aktivierenden Proteasen zu identifizieren, deren katalytische Zentren hohe Sequenzhomologie zu der bakteriellen Protease Subtilisin BPN<sup>1</sup> besitzen. Diese bilden die Familie der subtilisinähnlichen Endoproteasen (zur Übersicht: Denault und Leduc, 1996; Siezen und Leunissen, 1997; Steiner, 1998; Bergeron et al., 2000; Abb. 2).

Das Kexin der Hefe ist der Prototyp von 7 weiteren, in Säugetieren gewebsspezifisch exprimierten, subtilisinähnlichen Endoproteasen. Kexin besteht aus 814 Aminosäuren und ist ein Typ I Transmembranprotein. Im katalytischen Zentrum bilden die Aminosäuren Serin, Histidin und Aspartat eine Triade, die für Serinproteasen typisch ist. Analog zu den Serinproteasen Trypsin, Chymotrypsin und Subtilisin enthält das katalytische Zentrum von Kexin ein konserviertes Asparagin, das das kovalent gebundene Intermediat der Proteolyse stabilisiert (Bryan et al., 1986). Damit bildet Kexin den Prototyp der Familie der eukaryontischen, subtilisinähnlichen Endoproteasen.

Die subtilisinähnlichen Endoproteasen lassen sich ihrem Sekretionsweg zufolge in zwei Gruppen einteilen. Die Proteasen PC2 und PC1/PC3 wurden in Zellen mit reguliertem Sekretionsweg gefunden, z. B. in endokrinem und neuroendokrinem Gewebe. Sie spalten Substrate nach dibasischen Motiven der Form R-R und K-R (Seidah et al., 1990; Smeekens et al., 1991). Die mRNA von PC4 konnte bisher nur in runden Spermatiden von Maushodengewebe nachgewiesen werden, jedoch ohne Hinweis auf proteolytische Aktivität (De Strooper et al., 1995). Die Translate aller drei Enzyme enthalten keine hydrophobe Domäne und sind demnach lösliche Glykoproteine. Die Proteasen Furin (Fuller et al., 1989), PACE4 (Kiefer et al., 1991), PC5/PC6-A und PC6-B (Nakagawa et al., 1993a, b; Lusson et al., 1993) sowie LPC/PC7/PC8 (Meerabux et al., 1996; Constam et al., 1996; Munzer et al., 1997) werden in den meisten Zellen transkribiert und intrazellulär über den konstitutiven Sekretionsweg transportiert. Furin, PC6-B und LPC/PC7/PC8 sind Transmembranproteine vom Typ I, während es sich bei PACE4 und PC5/PC6-A um lösliche Proteine handelt (Abb. 2).

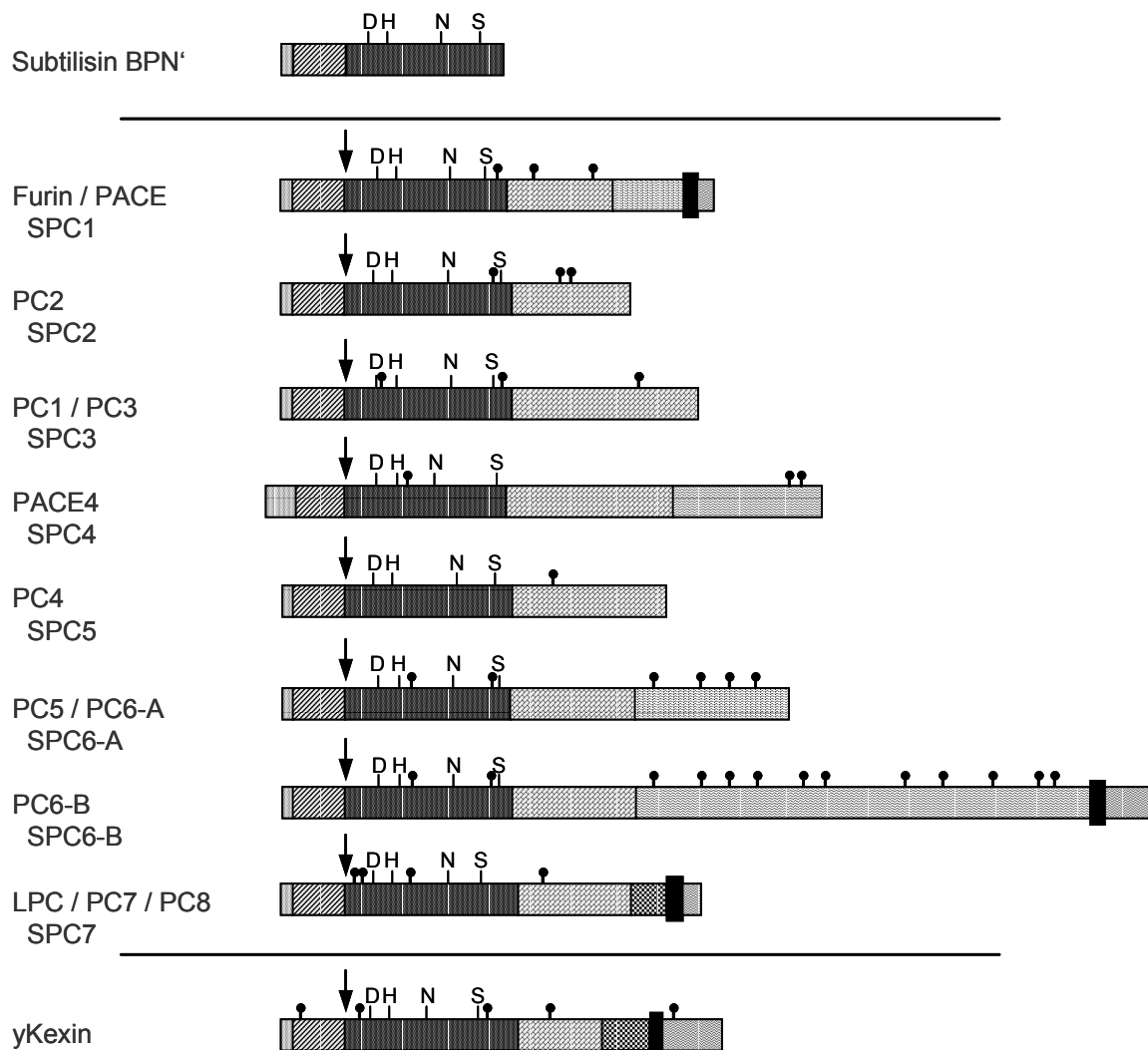


Abb. 2: Übersicht und Aufbau der eukaryontischen subtilisinähnlichen Endoproteasen SPC1 bis SPC7 im Vergleich zu Subtilisin BPN' (*Bacillus Protease N'* aus *Bacillus amyloliquefaciens*) und Kexin (aus *Saccharomyces cerevisiae*). SPC: *subtilisin-like proprotein convertase*.

### 1.3 Furin

Furin (*SPC1*), ein integrales Typ I Transmembranprotein (Abb. 2), ist eine ubiquitär vorkommende Proproteinconvertase und gilt als Schlüsselenzym der eukaryontischen subtilisinähnlichen Endoproteasen (zur Übersicht: Nakayama, 1997). Furinspezifische mRNA konnte, im Gegensatz zu den anderen Proteasen dieser Familie, in allen bisher untersuchten Geweben nachgewiesen werden (Hatsuzawa et al., 1990). Furin ist nicht nur innerhalb der Wirbeltiere stark konserviert, sondern es kommt im gesamten Tierreich vor. Eine Übersicht der bisher beschriebenen Formen von Furin aus verschiedenen Organismen, deren Proteinlänge und Sequenzhomologie im Vergleich zum humanen Furin, zeigt Tab. 1.

Bezeichnung	Organismus	Proteinlänge [AA]	Sequenzhomologie [%]	Literatur
<b>HFurin</b>	<b>Mensch</b>	<b>794</b>	<b>100,0</b>	Van d. Ouweland et al., 1990
CgFurin	Hamster: <i>Cricetulus griseus</i>	794	96,7	Spence et al., 1995
BFurin	Rind: <i>Bos taurus</i>	797	96,4	Vey et al., 1994
MFurin	Maus: <i>Mus musculus</i>	793	96,1	Hatsuzawa et al., 1990
RFurin	Ratte: <i>Rattus norvegicus</i>	793	95,8	Misumi et al., 1990
GFurin	Huhn: <i>Gallus gallus</i>	789	88,4	Feldmann et al., 1995
XFurin	Krallenfrosch: <i>Xenopus laevis</i>	783	82,2	Korner et al., 1991
CeFurin	Fadenwurm: <i>Caenorhabditis elegans</i>	639	71,9	Gomez-Saladin et al., 1997
DFurin1s	Taufliege: <i>Drosophila melanogaster</i>	899	67,9	Roebroek et al., 1991
DFurin1l	Taufliege: <i>Drosophila melanogaster</i>	1101	65,7	Hayflick et al., 1992
<b>SFurin</b>	<b><i>Spodoptera frugiperda</i></b>	<b>1299</b>	<b>63,8</b>	Cieplik et al., 1998
DFurin1X	Taufliege: <i>Drosophila melanogaster</i>	1269	62,5	Roebroek et al., 1991
AcFurin	Schnecke: <i>Aplysia californica</i>	824	62,5	Nagle et al., 1995
DFurin2	Taufliege: <i>Drosophila melanogaster</i>	1680	61,4	Roebroek et al., 1992
LsFurin	Schnecke: <i>Lymnaea stagnalis</i>	837	60,9	Smit et al., 1994

**Tab. 1: Übersicht der aus verschiedenen Organismen isolierten Formen von Furin.** Dargestellt sind die Kurzbezeichnung, der Organismus und die Proteinlänge der bisher gefundenen Furin-Subtypen, die Sequenzhomologie auf Aminosäureebene im Vergleich zu humanem Furin und eine Literaturstelle.

### 1.3.1 Der Reifungsweg von Furin

Der Reifungsweg von humanen bzw. bovinen Furin ist sehr gut untersucht. Die Biosynthese von Furin als inaktives Proprotein beginnt am rauen Endoplasmatischen Retikulum (*rER*). Mit Hilfe des Signalpeptids wird es in das Lumen des ER transloziert, das Signalpeptid wird daraufhin kotranslational abgespalten. Die Prodomäne fungiert wahrscheinlich als intramolekulares Chaperon und hilft bei der korrekten Faltung von Furin. Nach einem autokatalytischen intramolekularem Spaltprozeß wird die Peptidbindung C-terminal der Furinerkennungssequenz zwischen Propeptid und katalytischer Domäne gespalten (Leduc et al., 1992; Creemers et al., 1994). Zunächst bleibt das Propeptid an Furin assoziiert und Furin inaktiv. Die korrekte Faltung und Prozessierung des Proteins ist unabdingbar, um das ER verlassen zu können (Vey et al., 1994). Im Golgi-Apparat findet die Spaltung innerhalb der Prodomäne nach den dibasischen Motiven R-R und K-R statt. Erst der im Vergleich zum ER niedrige pH-Wert des Golgi-Apparats ermöglicht die Dissoziation der Prodomäne und Furin erhält seine Aktivität. Im Golgi-Apparat finden auch die Modifikationen der Zuckerseitenketten in komplexe N-Glykane statt. Furin akkumuliert schließlich im TGN. In einem weiteren Proteolyseschritt zwischen TGN und Plasmamembran kann durch Abspalten der luminalen Domäne in der Nähe des Membranankers Furin als katalytisch aktive Form sezerniert werden. Die ankerlose lösliche Form des katalytisch aktiven Furins hat ein Molekulargewicht von 85 kDa (Vey et al., 1994). Jüngste Ergebnisse zeigen, daß humanes Furin sehr wahrscheinlich N-terminal des monobasischen Arg<sup>683</sup> gespalten wird (Plaimauer et al., 2001).

### 1.3.2 Der subzelluläre Transport und die Lokalisation von Furin

Furin ist vorwiegend im TGN lokalisiert. Dies ist das Resultat eines dynamischen Prozesses, bei dem Furin vom TGN zur Plasmamembran und von dort über die Endosomen zum TGN rezirkuliert (Bosshart et al., 1994; Molloy et al., 1994; Schäfer et al., 1995; Teuchert et al., 1999a, b). In geringem Ausmaß ist Furin als integrales Membranprotein in der Plasmamembran, in sekretorischen Vesikeln der Zelle und als lösliches Protein im Extrazellularraum zu finden.

Vier Signalmotive innerhalb der zytoplasmatischen Domäne von Furin wurden durch Mutagenesestudien gefunden, die den subzellulären Transport sowie die TGN-Lokalisation bestimmen: Ein saures Signal (SDSEEDE), ein Tyrosinmotiv (YKGL), ein Leucin-Isoleucin-

signal (LI<sup>760</sup>) und ein Phenylalanin (F<sup>790</sup>) (Schäfer et al., 1995; Stroh et al., 1999).

Das saure Signal ist für die TGN-Lokalisation essentiell (Schäfer et al., 1995; Voorhees et al., 1995). Es beinhaltet eine Kaseinkinase II Konsensussequenz: Serine oder Threonine, gefolgt von Glutamat oder Aspartat an Position +1 bis +3 werden als Substrate für die Phosphorylierung durch Kaseinkinase II erkannt (zur Übersicht: Kennelly und Krebs, 1991). Liegen die beiden Serine des sauren Signals im phosphorylierten Zustand vor, kann Furin von der Plasmamembran oder den Endosomen nicht zum TGN zurückkehren. Dies wird erst durch die Dephosphorylierung des sauren Signals möglich (Jones et al., 1995). Ausgehend vom TGN wird Furin über den Exozytoseweg zur Plasmamembran transportiert und dort erneut endozytiert. Das Tyrosinmotiv ist für die Reinternalisierung verantwortlich (Schäfer et al., 1995). Es ist ein verbreitetes Endozytosesignal der Konsensussequenz YXXØ, in der Ø eine sperrige, hydrophobe Aminosäure symbolisiert. Das Leucin-Isoleucinsignal und das einzelne Phenylalanin stellen zwei weitere Internalisierungssignale dar und steuern den vesikulären Transport von der Plasmamembran über die Endosomen zu den Lysosomen. Als Rückholsignal von den Endosomen zum TGN ist das saure Signal unbedingt notwendig, jedoch für sich allein nicht ausreichend, um Furin in das TGN zu dirigieren. Erst die Kooperation der Internalisierungssignale mit dem sauren Signal führt zur Anreicherung von Furin im TGN (Stroh, 1999; Teuchert et al., 1999a, b).

### **1.3.3 Zelluläre, bakterielle und virale Substrate von Furin**

Furin aktiviert eine Vielzahl zellulärer Proproteine und viraler Glykoproteine des konstitutiven Sekretionswegs, sowie bakterieller Toxine des Endozytosewegs durch spezifische Spaltung C-terminal des mehrbasigen Motivs R-X-K/R-R (Hosaka et al., 1991; Molloy et al., 1992; Hatsuzawa et al., 1992; Vey et al., 1992). Auch Variationen des Erkennungsmotivs der Form R-X-X-R (Molloy et al., 1992) oder R-X-X-X-K/R-R (Watanabe et al., 1993) treten auf. Zu den zellulären Substraten von Furin zählen u. a. die Vorläuferproteine des Insulinrezeptors (Robertson et al., 1993), des von Willebrandt Faktors (Wise et al., 1990), des Faktors IX (Wasley et al., 1993), des Nervenwachstumsfaktors (*NGF*) (Bresnahan et al., 1990), des Chromogranins A (Eskeland et al., 1996), des Albumins und des Komplementfaktors C3 (Misumi et al., 1991). Die proteolytische Spaltung findet bei neutralem pH-Wert statt und ist strikt Ca<sup>2+</sup>-abhängig, wie mit vektoriell exprimiertem

(Bresnahan et al., 1990; Molloy et al., 1992) und endogenem, zellulärem Furin (Oda, 1992; Stieneke-Gröber et al., 1992) gezeigt wurde.

Zu den bakteriellen Proteinen, die außerhalb des sekretorischen Transportwegs von Furin aktiviert werden, zählen das protektive Antigen (*PA II*) aus dem Milzbrandbazillus (*Bacillus anthracis*), das Exotoxin A aus *Pseudomonas aeruginosa*, das Diphtherietoxin aus *Corynebacterium diphtheriae* und das Shigatoxin aus Ruhrbakterien (*Shigella dysenteriae*) (Kimpel et al., 1992; Moehring et al., 1993; Tsuneoka et al., 1993; Garred et al., 1995a, b).

Viele umhüllte Viren tragen integrale Glykoproteine, die durch die Spaltung mit Furin fusionsaktiviert werden (zur Übersicht: Klenk und Garten, 1994). Dazu gehören u. a. die Glykoproteine der pathogenen aviären Influenza-A-Viren (*Subtypen H5 und H7*) (Stieneke-Gröber et al., 1992), des HIV-1 (Hallenberger et al., 1992, 1997), verschiedener Paramyxoviren (Gotoh et al., 1992; Moehring et al., 1993; Ortmann et al., 1994; Watanabe et al., 1995), des humanen Zytomegalievirus (Vey et al., 1995), des Bornavirus (Richt et al., 1998), des Marburgvirus (Volchkov et al., 1998) und des Ebolavirus (Volchkov et al., 2000).

#### **1.3.4 Furin Inhibitoren**

Peptidyl-Chloromethylketone (*cmk*) wie Dekanoyl-RVKR-cmk wurden erfolgreich zur spezifischen Hemmung von Furin eingesetzt. Sie imitieren ein Furin-Substrat und binden kovalent und irreversibel an das katalytische Zentrum von Furin. Mit Hilfe dieser Inhibitoren konnte die Spaltung zahlreicher viraler Glykoproteine lipidumhüllter Viren gehemmt werden, so daß die Zell-Zellfusion und Replikation dieser Viren unterbunden wurde. Dazu gehören das Hämagglutinin des Geflügelpestvirus (Garten et al., 1989, 1991, 1994, 1996; Stieneke-Gröber et al., 1992), das gp160 von HIV-1 (Hallenberger et al., 1992), das F-Protein des humanen Parainfluenzavirus Typ III (Ortmann et al., 1994) das gB des humanen Zytomegalievirus (Vey et al., 1995), das gp94 des Bornavirus (Richt et al., 1998) und das gp des Ebolavirus (Volchkov et al., 2000).

Kurze Peptide von ca. 6 bis 10 Aminosäuren, ohne reaktive Gruppen an ihren Enden, wurden mittels kombinatorischer Synthese in großer Zahl als Inhibitoren getestet. Dazu gehören u. a. das Peptid H<sub>2</sub>N-LLRVKR-CONH<sub>2</sub> (Apletalina et al., 1998) und Nona-L-Arginin (Cameron et al., 2000), das einige Proproteinkonvertasen im nanomolaren Konzentrationsbereich hemmt (DISKUSSION, 5.3.3).

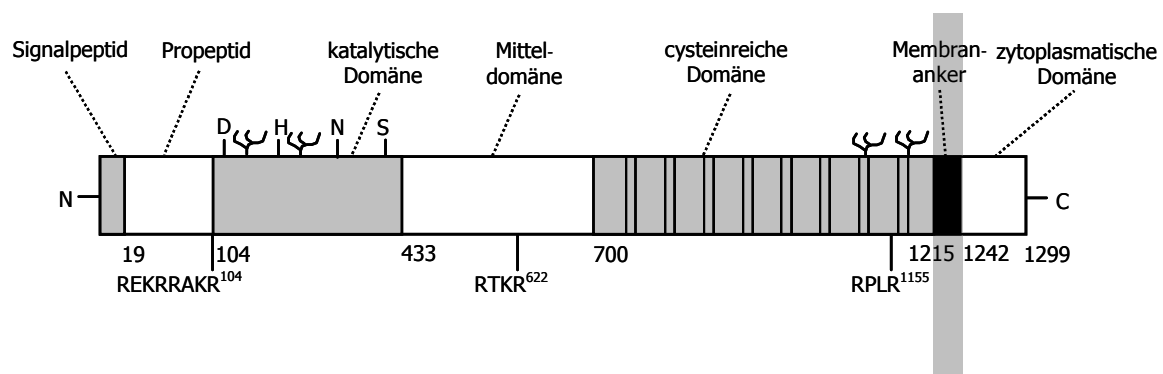


Mit vielen bekannten Proteaseinhibitoren konnte weder SFurin noch BFurin signifikant gehemmt werden (Cieplik et al., 1998). Serinproteaseinhibitoren wie Aprotinin, PMSF (*Phenylmethylsulfonylfluorid*), AEBSF (*4[2-Aminoethyl]-benzolsulfonylfluorid*), APMSF (*[4-Amidinophenyl]-methansulfonylfluorid*) und Leupeptin zeigten keine Inhibition der Furin-aktivität. Ebenso erfolglos wirkten Inhibitoren für Aspartatproteasen, Metalloendopeptidasen und Aminopeptidasen wie Pepstatin A, Phosphoramidon und Bestatin sowie Antipain-dihydrochlorid, ein Inhibitor für Papain, Trypsin und Cathepsin A und B. Chymostatin, ein Chymotrypsininhibitor, konnte die Furin-Aktivität bei Zugabe von 8  $\mu\text{M}$  des Inhibitors um 50 % senken. Cysteinproteaseinhibitoren wie Iodacetamid und E-64 zeigten in hohen Konzentrationen eine geringfügige Hemmung von Furin. DTT (*Dithiothreitol*) zeigte auch bei einer Konzentration von 1 mM keinen Effekt auf die Furin-Aktivität. Auf einige Schwermetallionen reagierte Furin sensitiv. SFurin und BFurin wurden durch Zugabe von 15  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  und  $\text{Cu}^{2+}$  vollständig gehemmt. Andere Metallionen wie  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Mn}^{2+}$  bewirkten eine nur geringfügige unspezifische Inhibition im millimolaren Konzentrationsbereich. SFurin und BFurin wurden durch 15  $\mu\text{M}$  EDTA bzw. EGTA vollständig inhibiert. Ein Schwermetall-Chelatbildner hingegen wie 1,10-Phenanthrolin führte erst im millimolaren Konzentrationsbereich zu einem geringfügigen Aktivitätsverlust (ANHANG: Tab. 2).

### 1.3.5 Aufbau und Eigenschaften von *Spodoptera frugiperda* Furin

Das in dieser Arbeit untersuchte SFurin, das von Cieplik et al., 1998 aus den Insektenlarven *Spodoptera frugiperda* identifiziert wurde, ist auf Aminosäureebene zu 63,8 % homolog zu humanem Furin und zeigt höchste Identität zu DFurin1X aus *Drosophila melanogaster* (1.3, Tab. 1).

Der Aufbau von *Spodoptera frugiperda* Furin (SFurin) ist in Abb. 3 dargestellt. SFurin beginnt aminoterminal mit einem 19 Aminosäuren langen Signalpeptid, gefolgt von der Prodomäne, die mit zwei aufeinanderfolgenden Furinmotiven ( $\text{REKR}^{100}$ ) und ( $\text{RIKR}^{104}$ ) endet. Die Prodomäne von Furin anderer Organismen enthält gewöhnlich nur eine Furinkonsensussequenz an ihrem Ende. Die sich anschließende katalytische subtilisin-ähnliche Domäne beherbergt das aktive Zentrum der Protease mit der katalytischen Triade aus Aspartat<sup>180</sup>, Histidin<sup>218</sup> und Serin<sup>399</sup> und der Oxyaniontasche aus Asparagin<sup>319</sup>. Die folgende Mitteldomäne, auch als P-Domäne bezeichnet, ist notwendig für die Aktivität von SFurin. Sie enthält ein weiteres Furinspaltnmotiv  $\text{RTKR}^{622}$ , das in anderen Furinspezies nicht vorkommt,



**Abb. 3: Schematischer Aufbau von SFurin.** Die Zahlen geben die Position der letzten Aminosäure einer Domäne an.

ebenso wenig wie ein viertes Furinspaltmotiv der Form RPLR<sup>1155</sup>. Beiden Motiven konnte bisher keine Bedeutung nachgewiesen werden. Zwischen Mitteldomäne und Membrananker liegt eine große cysteinreiche Domäne von 516 Aminosäuren, die 84 Cysteine enthält. Die Untersuchung der ebenfalls ausgedehnten cysteinreichen Domänen von DFurin2 und SPC6-B (*PC6-B*) führte zur Entdeckung eines für Furin charakteristischen Cysteinmotivs. Dieses besteht aus 8 Cysteinen, die durch beliebige Aminosäuren voneinander getrennt, jedoch in definierten Abständen zueinander angeordnet sind (Roebroeck et al., 1992; Nakagawa et al., 1993b). Die Sequenz des Motivs lautet C-x<sub>2</sub>-C-x<sub>3</sub>-C-x<sub>3</sub>-C-x<sub>(5-7)</sub>-C-x<sub>2</sub>-C-x<sub>(10-12)</sub>-C-x<sub>3</sub>-C. Es ist daher ca. 37 Aminosäuren lang. Dieses Motiv kommt in PACE4 (*SPC4*) viermal, in SFurin und DFurin2 jeweils neunmal und in PC6-B (*SPC6-B*) neunzehnmal hintereinander vor. Die Abstände zwischen den Motiven betragen 9 bis 16 Aminosäuren (Lusson et al., 1993). SFurin enthält vier potentielle N-Glykosylierungsstellen, zwei zu Beginn der katalytischen Domäne und zwei am Ende der cysteinreichen Domäne. Dem hydrophoben, 29 Aminosäuren langen Membrananker folgt schließlich die 84 Aminosäuren lange zytoplasmatische Domäne. Sie enthält die drei Internalisierungssignale YRSL<sup>1265</sup>, FTYL<sup>1275</sup> und LL<sup>1293</sup>, die für den subzellulären Transport von Furin verantwortlich sind.

## 1.4 Aufgabenstellung und Ziel der Arbeit

Die Identifizierung der thermostabilen, subtilisinähnlichen Endoprotease Furin aus *Spodoptera frugiperda* und die Charakterisierung des Enzyms aus Zellkulturüberständen Baculo-Virus infizierter Zellen erfolgte durch Cieplik et al., 1998.

Die Aufgabe dieser Arbeit bestand in der Expression von katalytisch aktivem *Spodoptera frugiperda* Furin (SFurin) mittels rekombinanter Baculoviren in Sf9-Zellen und der chromatographischen Reinigung des Enzyms. Das gereinigte SFurin sollte enzymatisch, mit Hilfe eines neuartigen *in vitro* Enzymtests charakterisiert werden. Mittels verschiedener Peptid-Inhibitoren sollte anschließend die spezifische Furin-Aktivität gehemmt werden. Zwei verschiedene Klassen von Peptidinhibitoren sollten getestet werden. Kovalent bindende Chloromethylketon-Derivate und kompetitiv hemmende Peptide, ohne reaktive Gruppen an ihren Enden. Der Vergleich der Inhibitoren sollte anhand ihrer spezifischen Hemmkonstante  $k_i$  erfolgen, die mit Hilfe des *in vitro* Enzymtests ermittelt werden sollte.

Zu den potentiellen Inhibitoren gehört auch die Prodomäne von SFurin. Ziel war, diese Domäne bakteriell, rekombinant zu exprimieren und chromatographisch zu reinigen. Die gereinigte Domäne sollte als Inhibitor eingesetzt und charakterisiert werden. Die dreidimensionale Struktur der Domäne ist von großem Interesse, die mittels Röntgenstrukturaufklärung ermittelt werden kann. Dazu sollte die gereinigte SFurin-Prodomäne kristallisiert werden.

Aus den ermittelten Hemmkonstanten und dem Aufbau der untersuchten Inhibitoren sollen neue Erkenntnisse über den Aufbau eines möglichst effizienten Furininhibitors gewonnen werden. Spezifische Furininhibitoren könnten zukünftig in der antiviralen Therapie eingesetzt werden.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Acrylamidstammlösung, Rotiphorese 30 (30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid)	Roth, Karlsruhe
Agarose NA ( <i>ultra pure</i> )	Pharmacia, Freiburg
$\epsilon$ -Aminocaprinsäure	Merck, Darmstadt
Ammoniumsulfat ( <i>p.a.</i> )	Merck, Darmstadt
Ampicillin, Na-Salz	Serva, Heidelberg
Amylose-Harz	NEB, Frankfurt
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	BioRad, München
ATP (Adenosin-5'-triphosphat), Na-Salz	Roche, Mannheim
Bactoagar	Difco, Detroit, USA
Biomax MR ( <i>Scientific Imaging Film</i> )	Kodak, Stuttgart
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA (Bovines Serumalbumin)-Standardlösung	Pierce, Rockfort, USA
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
CELLFECTIN <sup>®</sup> Reagenz	Gibco BRL, Karlsruhe
Centriprep-3; Centricon-3; Microcon-3 Konzentratoren	Amicon, Millipore, Bedford, USA
CHES (2-(Cyclohexylamino)-ethansulfonsäure)	Sigma, Steinheim
Coomassie-Brilliant Blau R-250 Tabletten	Merck, Darmstadt
Coomassie Plus Protein Assay Reagent	Pierce, Rockfort, USA
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DMF (Dimethylformamid)	Merck, Darmstadt
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
DNA-Längenstandard III und VI	Roche, Mannheim
DTT (Dithiothreitol; 1,4-Dithiol-2,3-dihydroxybutan)	Roth, Karlsruhe
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Merck, Darmstadt
Essigsäure 100% ( <i>Eisessig</i> )	Merck, Darmstadt
Ethanol, abs.	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roche, Mannheim
Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Formamid	Sigma, Steinheim
Gentamycin	Biochrom, Karlsruhe
L-Glutamin (200mM sterile Lösung)	Gibco BRL, Karlsruhe
Glucose	Sigma, Steinheim
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Merck, Darmstadt
Grace's Insect Medium (2x)	Gibco BRL, Karlsruhe
Harnstoff ( <i>ultra pure</i> )	Gibco BRL, Karlsruhe

Hefeextrakt ( <i>granuliert</i> )	Merck, Darmstadt
HEPES ([4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure)	Sigma, Steinheim
IPTG (1-Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid)	Roche, Mannheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma, Steinheim
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Maltose-Monohydrat ( <i>Grade I</i> )	Sigma, Steinheim
Manganchlorid	Sigma, Steinheim
$\beta$ -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
MES (2-Morpholinoethansulfonsäure-Monohydrat)	Sigma, Steinheim
Millex <sup>®</sup> -GV Spritzenfilter ( <i>Durapore Membrane</i> )	Millipore, Bedford, USA
NAP <sup>™</sup> -5, NAP <sup>™</sup> -10, NAP <sup>™</sup> -25 -Säulen ( <i>Sephadex G-25</i> )	Pharmacia, Freiburg
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumformamid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Neutralrot	Merck, Darmstadt
Nitrocellulose-Membran	Schleicher & Schuell, Dassel
N-Octylglucosid ( <i>p.a.</i> )	Roche, Mannheim
PEG-8000 (Polyethylenglykol)	Sigma, Steinheim
Pepton ( <i>aus Kasein verdaut</i> )	Merck, Darmstadt
PolyPrep Chromatography Columns	BioRad, München
Pyronin G	Serva, Heidelberg
Rainbow-Marker ( <i>RNP 756, low MW range</i> )	Amersham, Braunschweig
Rainbow-Marker ( <i>RNP 800, full MW range</i> )	Amersham, Braunschweig
Saccharose	Serva, Heidelberg
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Sea Plaque Agarose	BMA, Rockland, USA
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Merck, Darmstadt
Sofortbildfilm ( <i>Typ 667</i> )	Polaroid, Cambridge, MA, USA
Streptavidin-biotinylated horseradish Peroxidase (POX)	Amersham, Braunschweig
<i>Super Signal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate</i>	Pierce, Rockfort, USA
TC-100 Insect Medium	PAN Biotech, Aidenbach
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	BioRad, München
Terminationsmix ( <i>DNA-Sequencing Ready Reaction Kit</i> )	Perkin Elmer, Weiterstadt
Tetracyclin	Roche, Mannheim
Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween-20	Serva, Heidelberg
X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid)	Pierce, Rockfort, USA
Xylencyanol	Serva, Heidelberg

## 2.2 Enzyme

Ampli-Taq-DNA-Polymerase (5U/μl)	Roche, Mannheim
DNase I (aus Rinderpankreas)	Roche, Mannheim
Faktor Xa (1U/μl)	NEB, Frankfurt
Lysozym	Roche, Mannheim
PreScission™ Protease (2U/μl)	Pharmacia, Freiburg
Protease-Inhibitoren-Cocktail-Tabletten (Complete™)	Roche, Mannheim
RNase (aus Rinderpankreas)	Roche, Mannheim
SAP (shrimps alkaline phosphatase)	Amersham, Braunschweig
T4-DNA-Ligase (5U/μl)	Roche, Mannheim
T4-DNA-Polymerase (2-4U/μl)	Roche, Mannheim
T4 5'-Polynukleotidkinase (10U/μl)	Roche, Mannheim

### Restriktionsendonukleasen:

BamHI (10U/μl)	5' G <sup>↓</sup> GATCC 3'	Roche, Mannheim
EcoRI (10U/μl)	5' G <sup>↓</sup> AATTC 3'	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
HindIII (10U/μl)	5' A <sup>↓</sup> AGCTT 3'	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
NdeI (10U/μl)	5' CA <sup>↓</sup> TATG 3'	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
NheI (10U/μl)	5' G <sup>↓</sup> CTAGC 3'	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
NotI (10U/μl)	5' GC <sup>↓</sup> GGCCGC 3'	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
SalI (10U/μl)	5' G <sup>↓</sup> TCGAC 3'	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
XhoI (10U/μl)	5' C <sup>↓</sup> TCGAG 3'	Roche, Mannheim

Die Restriktionsendonukleasen wurden in 10-fach konzentrierten Inkubationspuffern nach Herstellerangaben der Firmen Roche, Mannheim oder MBI Fermentas, St. Leon-Rot eingesetzt.

## 2.3 Oligonukleotide

Folgend aufgelistete Oligonukleotide wurden entweder von Herrn Dr. M. Krause<sup>1)</sup> im Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) der Philipps-Universität Marburg synthetisiert oder von der Fa. Sigma-Genosys<sup>2)</sup>, Pampisford Cambridge, England erworben.

Nomenklatur	Anwendung	Basensequenz in 5'→3'-Richtung
PSP10HisF2 <sup>1)</sup>	Clone	CTT AGC TAT <u>CTC GAG</u> <u>GCT AGC</u> CTG GAA GTT <i>PSP</i> <i>10 x His</i> CTG TTC CAG GGG CCC CAT CAC CAT CAC CAT <i>STOPP</i> <i>HindIII</i> CAC CAT CAC CAT CAC <u>TGA</u> <u>AAG CTT</u> TCA GGA GCG
PSP10HisR2 <sup>1)</sup>	Clone	CGC TCC TGA <u>AAG CTT</u> <u>TCA</u> GTG ATG GTG ATG <i>10 x His</i> <i>PSP</i> GTG ATG GTG ATG GTG ATG GGG CCC CTG GAA <i>NheI</i> <i>XhoI</i> CAG AAC TTC CAG <u>GCT AGC</u> <u>CTC GAG</u> ATA GCT AAG
SFurF 1947-1974 <sup>1)</sup>	Clone	CCT ATC TGC <u>GCA TAT</u> GGA CGT TAA TGG G <i>NdeI</i>
SFurR 2547-2521 NheI <sup>1)</sup>	Clone	AAC TTC CAG <u>GCT AGC</u> GTC ATG CAT GAC GCG CTT GTC ATT AC
fSFur 505 EcoRI <sup>2)</sup>	Clone	GCT <u>GAA TTC</u> CTC CCG GAG CCG GTG TAC CAC GAC
rSFur 759 SalI (STOP) <sup>2)</sup>	Clone	GCT <u>GTC GAC</u> <u>TCA</u> CCT CTT TAT ACG CCG CTT TTC
BAC 1F 3955-3975 <sup>1)</sup>	Seq	ATC GTT TTC GTA ACA GTT TTG
BAC 1R 4242-4221 <sup>1)</sup>	Seq	TAT GTT TCA GGT TCA GGG GGA G
pMAL-c2 forward <sup>2)</sup>	Seq	GGT CGT CAG ACT GTC GAT GAA GCC
pMAL-c2 reverse <sup>2)</sup>	Seq	GGG ATG TGC TGC AAG GCG ATT AAG

Clone: Klonierungsprimer

Seq: Sequenzierprimer

XXX: Stopp-Codon

XXX XXX: Restriktionsschnittstelle

XXX.....: PSP (*PreScission Protease Spaltsequenz*)

XXX.....: 10x His (*Poly-Histidin*)

## 2.4 Vektoren und Matrizen

pGEX-6P-1

Pharmacia, Freiburg

Vektor zur bakteriellen Expression von GST-Fusionsproteinen.

pCR 2.1

Invitrogen, CH Groningen Niederlande

Vektor zur Subklonierung von beliebigen PCR-Amplifikaten mittels *taq*-Polymerase.

pMAL-c2

NEB, Frankfurt

Vektor zur bakteriellen Expression von Maltosebindungs-Fusionsproteinen.

pFASTBAC1

Gibco BRL, Karlsruhe

Vektor zur Erzeugung rekombinanter Baculo-Viren mittels sequenzspezifischer Transposition.

pBluescript SK/sfur 93-6385 (*Klon 5*)

Michael Cieplik, Marburg 1996

Vektor, der die SFurin cDNA bp 93-6385 enthält (Sequenz siehe ANHANG).



## 2.5 Bakterienstämme und Zelllinien

### 2.5.1 Bakterienstämme

<b>E. coli</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Firma</b>
BL-21	F <sup>-</sup> , ompT, r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup>	Pharmacia, Freiburg
DH5α	supE44, ΔlacU169(φ80lacZΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1	Gibco BRL, Karlsruhe
MAX EFFICIENCY <sup>®</sup> DH10BAC <sup>™</sup> Competent Cells	F <sup>-</sup> mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ <sup>-</sup> rpsL nupG / bMON14272 /pMON7124	Gibco BRL, Karlsruhe
TOP10F <sup>'</sup> Competent Cells	F <sup>-</sup> {lacI <sup>q</sup> Tn10 (Tet <sup>R</sup> )} mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str <sup>R</sup> ) endA1 nupG	Invitrogen, CH Groningen Niederlande
XL1 Blue	K12, rec A1, lac <sup>-</sup> , endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, (F <sup>'</sup> pro AB, lacI <sub>q</sub> , lacZΔM15, Tn10)	Stratagene, Heidelberg

### 2.5.2 Zelllinien

<b>Zelllinie</b>	<b>Insekten-Spezies</b>	<b>Firma</b>
Sf9 (Isolat aus IPLB-Sf21-AE)	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Invitrogen, CH Groningen Niederlande
High-Five <sup>™</sup> BTI-TN-5B1-4	<i>Trichoplusia ni</i>	Invitrogen, CH Groningen Niederlande

## 2.6 Kits

ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer, Weiterstadt
BAC-TO-BAC™ Baculovirus Expression System	Gibco BRL, Karlsruhe
Chemoluminiszenz Kit ( <i>super signal</i> )	Pierce, Rockfort, USA
Crystal Screen I, II Macromolecular Crystallization Reagent Kit	Hampton Research, Laguna Hills, CA, USA
GeneAmp PCR Core Reagent Kit	Perkin Elmer, Weiterstadt
QIAquick PCR-Reinigungs Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gelextraktions Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Plasmid Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep 8 Plasmid Kit	Qiagen, Hilden
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
SilverQuest™ Silver Staining Kit	Invitrogen, CH Groningen, Niederlande
TA Cloning® Kit	Invitrogen, CH Groningen, Niederlande

## 2.7 Nährmedien und Puffer für Bakterien- und Zellkultur

• LB-Medium:	10 g	Pepton
	5 g	Hefeextrakt
	10 g	NaCl
	ad 1000 ml	dH <sub>2</sub> O
• <i>low salt</i> LB-Medium mit Glucose:	10 g	Pepton
	5 g	Hefeextrakt
	5 g	NaCl
	0,2 %	Glucose
	ad 1000 ml	dH <sub>2</sub> O
• LB-Agar:	15 g	Bactoagar
	ad 1000 ml	LB-Medium
<i>Ggf. zur Blau-Weiß-Selektion</i>	100 µg/ml	<i>X-Gal</i>
	40 µg/ml	<i>IPTG</i>

---

• LB-Bacmid Agar:	12 g	Bactoagar
	50 µg/ml	Kanamycin
	7 µg/ml	Gentamycin
	10 µg/ml	Tetracyclin
	100 µg/ml	X-Gal
	40 µg/ml	IPTG
	ad 1000 ml	LB-Medium

• SOC-Medium:	20 g	Pepton
	5 g	Hefeextrakt
	0,5 g	NaCl
	2,5 mM	KCl
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
	20 mM	Glucose
	ad 1000 ml	dH <sub>2</sub> O

Die Medien wurden autoklaviert (*15 min, 121°C, 1 bar*). Antibiotika bzw. Glucose wurden gegebenenfalls nach Abkühlen auf 50°C zugesetzt. Die Konzentration für Ampicillin beträgt 100 µg/ml.

• PBS-Puffer:	8,00 g	NaCl
	0,20 g	KCl
	1,15 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	0,20 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	ad 1000 ml	dH <sub>2</sub> O

• TSS-Puffer:	85 % (v/v)	LB-Medium
	10 % (w/v)	PEG 8000
	5 % (v/v)	DMSO
	50 mM	MgCl <sub>2</sub>

Der Puffer wurde auf pH 6,5 eingestellt und sterilfiltriert (*bei 4°C ca. 4 Wochen haltbar*).

• Plaque-Agar A:	50 % (v/v)	Grace's Insect Medium (2x) mit 20 % FCS
	50 % (v/v)	2,5 % Sea Plaque Agarose in PBS

• Plaque-Agar B:	50 % (v/v)	0,02 % Neutralrot in dH <sub>2</sub> O
	50 % (v/v)	2,5 % Sea Plaque Agarose in PBS

Die Komponenten des Plaque-Agars A bzw. B wurden jeweils bei 42°C gemischt.

## 2.8 Puffer für Elektrophorese und Elektroblothing

- |                           |            |                   |
|---------------------------|------------|-------------------|
| • 10x TBE-Puffer, pH 8,0: | 108 g      | Tris              |
|                           | 55 g       | Borsäure          |
|                           | 40 ml      | 0,5 M EDTA        |
|                           | ad 1000 ml | dH <sub>2</sub> O |
- |                      |       |          |
|----------------------|-------|----------|
| • TE-Puffer, pH 8,0: | 10 mM | Tris-HCl |
|                      | 1 mM  | EDTA     |
- |                                    |        |                                 |
|------------------------------------|--------|---------------------------------|
| • 6x Probenpuffer für Agarosegele: | 0,23 % | Bromphenolblau bzw. Xylencyanol |
|                                    | 40 %   | Saccharose                      |
|                                    | in     | TE-Puffer                       |
- |   |         |                 |
|---|---------|-----------------|
| • Ethidiumbromidlösung zum Anfärben von Agarosegelen: | 0,006 % | Ethidiumbromid  |
|   | in      | 0,5x TBE-Puffer |
- |                                    |          |              |
|------------------------------------|----------|--------------|
| • Probenpuffer für Sequenziergele: | 25 mM    | EDTA, pH 8,0 |
|                                    | 50 mg/ml | Dextranblau  |

---

	1 : 5	mit deionisiertem Formamid versetzen
--	-------	--------------------------------------
- |                                    |               |                   |
|------------------------------------|---------------|-------------------|
| • 6x Probenpuffer für Proteingele: | 380 mM        | Tris-HCl, pH 6,8  |
|                                    | 10,28 % (w/v) | SDS               |
|                                    | 36,0 %        | Glycerin          |
|                                    | 5,0 %         | β-Mercaptoethanol |
|                                    | 0,012 % (w/v) | Bromphenolblau    |
- |                                   |            |                   |
|-----------------------------------|------------|-------------------|
| • 10x Laufpuffer für Proteingele: | 10 g       | SDS               |
|                                   | 30 g       | Tris              |
|                                   | 144 g      | Glycin            |
|                                   | ad 1000 ml | dH <sub>2</sub> O |
- |  |            |  |
|--|------------|--|
| • Coomassie Färbelösung für Proteingele: | 16         | Coomassie-Brilliant Blau R-250 Tabletten |
|  | 400 ml     | Ethanol                                  |
|  | 100 ml     | Eisessig                                 |
|  | ad 1000 ml | dH <sub>2</sub> O                        |
- |                   |            |                      |
|-------------------|------------|----------------------|
| • Anodenpuffer I: | 100 ml     | 1 M Tris-HCl, pH 9,0 |
|                   | 200 ml     | Ethanol              |
|                   | ad 1000 ml | dH <sub>2</sub> O    |

- 
- Anodenpuffer II:
 

25 ml	1 M Tris-HCl, pH 7,4
200 ml	Ethanol
ad 1000 ml	dH <sub>2</sub> O
  
  - Kathodenpuffer:
 

25 ml	1 M Tris-HCl, pH 9,0
5,25 g	ε-Aminocaprinsäure
200 ml	Ethanol
ad 1000 ml	dH <sub>2</sub> O

## 2.9 Puffer für Proteinexpression, Reinigung und Enzymaktivitätstest

- PreScission™ Protease-Spaltpuffer:
 

50 mM	Tris-HCl, pH 7,0
150 mM	NaCl
1 mM	EDTA
1 mM	DTT
  
- MBP-Bindungspuffer:
 

20 mM	Tris-HCl, pH 7,4
200 mM	NaCl
1 mM	EDTA
  
- MBP-Elutionspuffer:
 

20 mM	Tris-HCl, pH 7,4
200 mM	NaCl
1 mM	EDTA
10 mM	Maltose
  
- Puffer für « Desalting »
 

100 mM	HEPES, pH 7,0
--------	---------------
- Puffer A für « MonoQ »
 

10 mM	NaCl
-------	------
- Puffer für « Superdex-75 »
 

2 mM	CaCl <sub>2</sub>
------	-------------------
  
- Puffer B für « Mono-Q »
 

100 mM	HEPES, pH 7,0
1 M	NaCl
2 mM	CaCl <sub>2</sub>
  
- Puffer A für « Mono-S »
 

50 mM	HEPES, pH 7,6
25 mM	NaCl
  
- Puffer B für « Mono-S »
 

50 mM	HEPES, pH 7,6
1 M	NaCl

- Enzymaktivitätstest-Puffer:
 

100 mM	HEPES, pH 7,0
2 mM	CaCl <sub>2</sub>
0,5 %	Triton X-100
1 mM	Mercaptoethanol

## 2.10 Sythetische Peptide

	Peptidaufbau	Hersteller
<b>S</b>	Abz-RVKRGLAY(NO <sub>2</sub> )D-OH	Bachem, Heidelberg
<b>A</b>	dec-RVKR-cmk	
<b>B</b>	dec-RVRK-cmk	
<b>C</b>	biotinyl-ε-aminocaproyl-RVKR-cmk	
<b>D</b>	H <sub>2</sub> N-HRYRVCRC-CONH <sub>2</sub>	Dr. M. Krause, Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT) der Philipps- Universität Marburg
<b>E</b>	H <sub>2</sub> N-LLRVKR-CONH <sub>2</sub>	
<b>F</b>	H <sub>2</sub> N-RRRRRRRRR-CONH <sub>2</sub>	
<b>G</b>	myristyl-RRRRRRRRR-CONH <sub>2</sub>	
<b>H</b>	H <sub>2</sub> N-PRHSRLQREPQVQWLEQQVAKRRTKR-CONH <sub>2</sub>	
<b>I</b>	myristyl-PRHSRLQREPQVQWLEQQVAKRRTKR-CONH <sub>2</sub>	
<b>J</b>	H <sub>2</sub> N-QQVAKRRTKR-CONH <sub>2</sub>	
<b>K</b>	myristyl-QQVAKRRTKR-CONH <sub>2</sub>	

*Abz: 2-Aminobenzoyl*

*cmk: Chloromethylketon*

*dec: Decanoyl*

## 2.11 Geräte und Systeme

ABI PRISM 377 DNA Sequencer	Perkin Elmer, Weiterstadt
ÄKTA™-FPLC Chromatographie-System	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
DU-40 Spectrophotometer	Beckman/Coulter, Unterschleißheim
GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer, Weiterstadt
LS-5B Luminescence Spectrometer	Perkin Elmer, Weiterstadt

## 2.12 Chromatographiesäulen

Hi-Trap Chelating	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hi-Trap Phenyl Sepharose 6 Fast Flow ( <i>high sub</i> )	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hi-Trap Octyl Sepharose 4 Fast Flow	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
HiPrep 26/10 Desalting	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
HiPrep 16/60 Sephacryl S-300	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
MonoQ HR 5/5	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
MonoS HR 5/5	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

## 3 Methoden

### 3.1 Klonierungstechniken

#### 3.1.1 Reinigung von Oligonukleotiden

Oligonukleotide sind nach der automatisierten Synthese in einer 25 %igen Ammoniaklösung gelöst. Durch Überleiten von Stickstoff unter dem Abzug wurde der Ammoniak abgedampft. Salze und abgespaltene Schutzgruppen wurden mit Hilfe einer mit dH<sub>2</sub>O äquilibrierten NAP<sup>TM</sup>-5 Säule entfernt und die Oligonukleotide mit 1 ml dH<sub>2</sub>O wieder eluiert. Die Konzentration der Oligonukleotidlösung wurde wie in 3.1.2 beschrieben bestimmt.

Lyophilisierte Oligonukleotide wurden in einer definierten Menge dH<sub>2</sub>O in der gewünschten Konzentration gelöst.

Oligonukleotidlösungen wurden bei -20°C aufbewahrt.

#### 3.1.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Nukleinsäurebasen besitzen ein UV-Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 260$  nm. Nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz ist die Nukleinsäurekonzentration der Absorption (*hier: OD - optische Dichte*) proportional und es gelten folgende Näherungswerte:

Oligonukleotide:  $OD_{260nm} = 1 \rightarrow c = 20 \mu g/ml$

Doppelsträngige DNA:  $OD_{260nm} = 1 \rightarrow c = 50 \mu g/ml$

Da die aromatischen Aminosäuren von Proteinen ein Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 280$  nm besitzen, gibt der Quotient der bei 260 nm und 280 nm ( $OD_{260/280}$ ) gemessenen Absorptionskoeffizienten Aufschluß über die Reinheit einer Nukleinsäurepräparation. Reine DNA-Lösungen besitzen einen Quotienten  $OD_{260/280}$  zwischen 1,80 und 1,95.

#### 3.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein *in vitro*-Verfahren zur selektiven DNA-Amplifikation. Wichtigste Komponente dieser Methode ist die bis zu 95°C hitzestabile Taq-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus*, die DNA bei einem Temperaturoptimum von 72°C mit einer Fehlerrate von ca.  $2 \times 10^{-4}$  repliziert. Die PCR besteht aus mehreren Zyklen



einer dreistufigen Reaktionsfolge: Denaturierung der dsDNA in Einzelstränge, Hybridisierung zweier spezifischer, zu jeweils einem der beiden Einzelstränge komplementärer Primer und Synthese der DNA. Nach 25 Zyklen gelangt man zur  $10^6$  -  $10^7$  fachen Vermehrung der durch die Oligonukleotide flankierten DNA-Sequenz.

Die Reaktionen wurden mit Hilfe des *GeneAmp PCR Core Reagent Kits* und dem *GeneAmp PCR System 2400* der Fa. *Perkin Elmer* durchgeführt.

Standard PCR-Ansatz:

Komponenten	Volumen	Endkonzentration
10x PCR-Puffer: 100 mM Tris-HCl, pH 8,3 500 mM KCl 25 mM MgCl <sub>2</sub>	10,0 µl	10 mM 50 mM 2,5 mM
dNTP	4,0 µl	400 µM
Sense Primer	x µl	1 µM
Antisense Primer	x µl	1 µM
Ampli-Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl	2,5 U / 100 µl
DNA-Matrize	x µl	200 ng / 100µl
steriles dH <sub>2</sub> O	ad 100,0 µl	

Standard Zyklusparameter:

Vor dem 1. Zyklus	95°C	5 min	
Denaturierung	95°C	1 min	25 x
Hybridisierung der Primer	50°C	1 min	
DNA-Synthese	72°C	1 min	
Nach dem letzten Zyklus	72°C	5 min	
Reaktionsende	4°C	∞	

### 3.1.4 Reinigung von PCR-Fragmenten

Die Reinigung von DNA erfolgte mit Hilfe des *QIAquick PCR Reinigungskits* nach Herstellerangaben. Das Prinzip der Reinigung beruht auf der Adsorption von DNA an eine Silikamatrix in Anwesenheit von chaotropen Substanzen wie NaI (Vogelstein und Gillespie, 1979), die die Hydratation der DNA verhindern. Puffer hoher Salzkonzentration begünstigen die Anlagerung der DNA an die Matrix. Die Elution der DNA nach dem Waschen des Säulenmaterials erfolgt schließlich durch einen Puffer niedriger Salzkonzentration.

### 3.1.5 Restriktionsverdau von dsDNA

Restriktionsendonukleasen schneiden dsDNA innerhalb palindromischer Zielsequenzen in Fragmente definierter Größe und erzeugen gleichzeitig definierte 5'- und 3'-Enden für die weitere Klonierung des Gensegments.

Standard Reaktionsansatz für einen präparativen Restriktions-Doppelverdau:

Komponenten	Volumen
dsDNA (Vektor bzw. PCR-Fragment)	(2-5 µg)
10 x Inkubationspuffer	4,0 µl
Restriktionsendonuklease I	1,5 µl
Restriktionsendonuklease II	1,5 µl
steriles dH <sub>2</sub> O	ad 40,0 µl

Der Reaktionsansatz wurde 90 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die dsDNA wurde mit dem in 3.1.4 beschriebenen PCR Reinigungskit aufgearbeitet und die Vollständigkeit des Verdau durch Auftrennen der erhaltenen DNA-Fragmente im Agarosegel überprüft (3.1.7).

### 3.1.6 Phosphatasebehandlung linearisierter Plasmide

Um die unerwünschte Religation linearisierter Plasmide zu vermeiden, die das Inserieren von Fremd-DNA in einen Vektor verhindern würde, wurde der 5'-Phosphatrest des Vektors mit alkalischer Phosphatase aus Krabben (*SAP, shrimps alkaline phosphatase*) abgespalten.

5 µg linearisierte Plasmid-DNA wurde 1h bei 37°C mit 5U SAP in SAP-Puffer (200 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8,8) inkubiert. Anschließend wurde das Enzym bei 65°C 15 min inaktiviert.

### 3.1.7 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel

Zur Bestimmung der Reinheit und Größe von DNA Fragmenten nach dem Restriktionsverdau wurden diese in horizontalen Agarosegelen ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Je nach zu erwartender Fragmentgröße wurden 0,7 - 1,5 %ige Agarosegele eingesetzt. Zum Gießen der Gele wurde Agarose NA in 0,5x TBE-Puffer, der auch als Laufpuffer diente, aufgeköcht. Die Proben wurden vor dem Beladen des Gels mit 6x Probenpuffer vermischt. Mit einer Spannung von 150 V bei 20 cm Elektrodenabstand und einer Laufzeit von 30 min wurden die DNA-Fragmente aufgetrennt. Anschließend wurden die Nukleinsäurebanden mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid angefärbt, indem das Gel für 20 min in 0,006 % Ethidiumbromid-Lösung (0,5x TBE) geschwenkt wurde. DNA-Banden wurden anschließend im UV-Licht bei 302 nm sichtbar gemacht und gegebenenfalls mit einer Polaroid-Sofortbildkamera fotografiert.

Fragmentgröße und DNA-Menge wurden durch Vergleich mit einem DNA-Längenstandard abgeschätzt.

### 3.1.8 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Zur Extraktion eines DNA-Fragments aus einem Agarosegel wurde die gewünschte Bande unter langwelligem UV-Licht (365 nm) mit einem Skalpell ausgeschnitten. Mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kits* wurde die DNA nach Herstellerangaben aufgereinigt. Das Prinzip der Reinigung ist das bereits unter 3.1.4 beschriebene.

### 3.1.9 Ligation von Insert-DNA mit linearisierter Vektor-DNA

Die kohäsiven Enden der durch Restriktionsverdau linearisierten Vektor- und Insert-DNA sind in der Lage, durch komplementäre Basenpaarung zu ligieren, also ein rekombinantes Plasmid zu erzeugen. Die DNA-Ligase des T4-Bakteriophagen katalysiert hierbei die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einer freien 3'-Hydroxylgruppe und einer 5'-Phosphatgruppe, die sich im gleichen Strang der neu ligierten dsDNA gegenüberliegen. Die Effizienz der korrekten Ligation ist am größten, wenn das molare Verhältnis von eingesetzter Vektor-DNA zu Insert-DNA zwischen 1:3 und 1:5 liegt und das Reaktionsvolumen möglichst gering gehalten wird.

Standard-Ligationsansatz:

Komponenten	Volumen
Vektor-DNA ( $\approx 0,1$ ng/ $\mu$ l)	3 $\mu$ l
Insert-DNA ( $\approx 2,0$ ng/ $\mu$ l)	14 $\mu$ l
10 x Ligationspuffer: 0,5 M Tris-HCl 0,1 M MgCl <sub>2</sub> 50 mM DTT 10 mM ATP	2 $\mu$ l
T4-DNA-Ligase (5 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l

Ligationsbedingungen: Vor Zugabe der T4-DNA-Ligase wurde der Ansatz für 5 min bei 45°C inkubiert, um DNA-Sekundärstrukturen aufzulösen. Aufgrund der Instabilität von DTT als Reduktionsmittel und ATP als Kofaktor wurden diese stets frisch zugesetzt. Der Ligationsansatz wurde ü. N. bei 16°C inkubiert.

### 3.1.10 Übernachtskulturen und Stammkulturen

Für eine Übernachtskultur (*ÜNK*) wurden 3 ml LB-Medium mit einer Bakterienkolonie inokuliert und ü. N. bei 37°C mit 200 UpM auf einem Schüttelinkubator inkubiert.

Stammkulturen können bei -80°C für mehrere Jahre gelagert werden. Dazu wurden 850  $\mu$ l einer ÜNK mit 150  $\mu$ l sterilem Glycerin gut vermischt.

### 3.1.11 Transformation von DNA in kompetente *E. coli*-Bakterien

Zur Aufnahme von Fremd-DNA mußten kompetente *E. coli*-Zellen hergestellt werden (Chung et al., 1989). 300 µl einer *E. coli*-ÜNK wurden zum Animpfen von 30 ml LB-Medium eingesetzt und bei 37°C mit 200 UpM auf einem Schüttelinkubator bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5 angezüchtet. Die Kultur wurde 20 min auf Eis gekühlt und anschließend bei 4°C mit 1200 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 3 ml eiskalter TSS (*transformation and storage solution*) resuspendiert. Zur Transformation wurden 10 µl des Ligationsansatzes mit 200 µl kompetenter *E. coli*-Zellen in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde zum Temperaturschock 90 sec im Wasserbad auf 42°C erwärmt und bei RT umgehend mit 800 µl LB-Medium versetzt. Zur Ausbildung der Antibiotikumresistenz wurde der Ansatz für 1 h bei 37°C mit 200 UpM vorinkubiert.

Auf angewärmten, ampicillinhaltigen LB-Agarplatten wurden 100 µl und 800 µl des Transformationsansatzes ausgestrichen und bei 37°C ü. N. inkubiert.

### 3.1.12 Plasmid-DNA-Isolierung

Die Methode der Plasmid-DNA-Isolierung basiert auf der alkalischen Lyse von Bakterien (Birnboim and Doly, 1979) und der anschließenden Reinigung der Plasmid-DNA aus dem Lysisüberstand mittels Anionenaustauschchromatographie.

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA bis zu einer Menge von 20 µg (*DNA-Minipräparation*) wurde das *QIAprep Spin Plasmid Kit* oder eine Kombination aus dem *QIAprep 8 Plasmid Kit* und der Absaugkammer *QIAvac Vakuum Manifold 6S* verwendet. Plasmid-DNA bis zu 500 µg (*DNA-Maxipräparation*) wurde mit Hilfe des *QIAfilter Plasmid Maxi Kits* isoliert. Für die DNA-Präparationen wurde von den jeweiligen Klonen eine 3 ml ÜNK bzw. 100 ml ÜNK angesetzt. Die DNA wurde nach dem Protokoll der Fa. Qiagen isoliert. Reinheit und Menge der DNA wurden wie in 3.1.2 beschrieben bestimmt.

### 3.1.13 Enzymatische Sequenzierung von DNA

Zur DNA-Sequenzierung wurde die Kettenabbruchmethode nach Sanger angewandt (Sanger et al., 1977). Die Sequenzierung der DNA verlief automatisiert, mit Hilfe des *ABI PRISM 377 DNA Sequencers* und dem *ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* der Fa. Perkin Elmer.

Standard-Reaktionsansatz für die Terminations-PCR:

Komponenten	Volumen
Terminationsmix: A-, T-, G-, C- Dye Terminator dATP, dTTP, dITP, dCTP Tris-HCl, pH 9,0; MgCl <sub>2</sub> hitzestabile Phosphatase Ampli-Taq-DNA-Polymerase FS	4,0 µl
Sequenzierprimer (4 - 6 pmol)	0,5 µl
dsDNA-Matrize (0,1 - 1,0 µg)	10,0 µl
steriles dH <sub>2</sub> O	5,5 µl

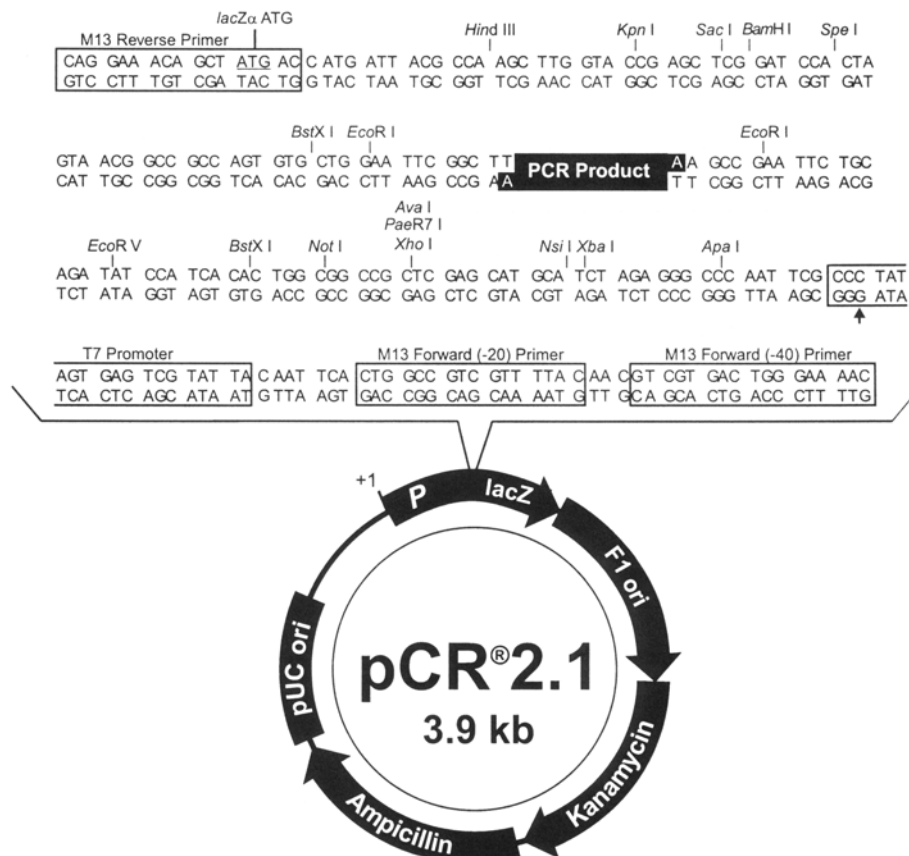
Zyklusparameter:	Vor dem 1. Zyklus	95°C	1 min	
	Denaturierung	95°C	10 sec	
	Hybridisierung der Primer	50°C	5 sec	25 x
	DNA-Synthese	60°C	4 min	
	Reaktionsende	4°C	∞	

Nach der Terminationsreaktion wurde die DNA gereinigt, indem sie durch Ethanol in Gegenwart von Salzen gefällt wurde. Dazu wurde der Terminationsansatz mit dH<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt und mit 2,5 Volumina abs. Ethanol und 1/10 Volumen 3M Natriumacetat-lösung pH 5,0 gut gemischt. Die präzipitierte DNA wurde 30 min bei RT mit 13000 UpM pelletiert und anschließend der Überstand vorsichtig dekantiert. Das Pellet wurde einmal mit 70 %igem Ethanol gewaschen, erneut 10 min zentrifugiert, dekantiert und schließlich 5 min in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

Die DNA wurde in 4 µl Formamid/EDTA Probenpuffer resuspendiert und anschließend 2 min bei 95°C denaturiert.

### 3.1.14 Subklonierung in den Vektor pCR 2.1

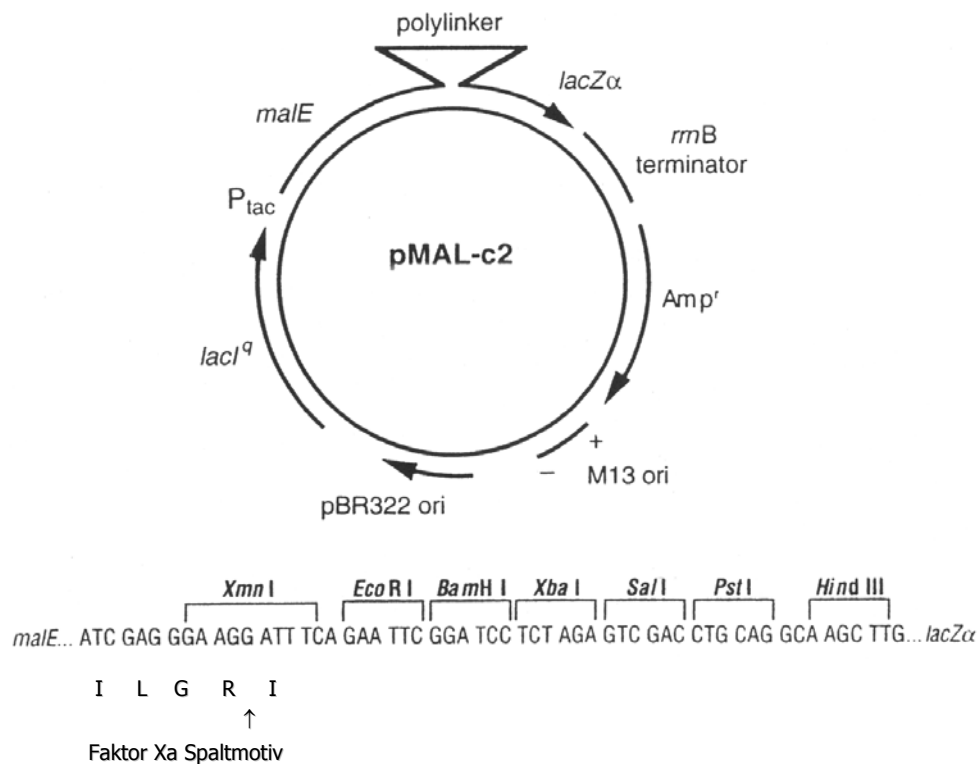
Mit dem *TA Cloning*<sup>®</sup> Kit der Fa. Invitrogen können Subklonierungen von beliebigen, mittels Taq-Polymerase erzeugten, PCR-Amplifikaten (3.1.3) in den Vektor pCR 2.1 durchgeführt werden (Abb. 4). Der bereits linearisierte Vektor trägt an seinen beiden 3'-Enden jeweils einen überhängenden Desoxythymidin-Rest, der mit den durch die Taq-Polymerase erzeugten 5'-Desoxyadenosin-Resten des PCR-Produkts ligiert werden kann. Zur Insertion eines beliebigen PCR-Produkts sind somit keine überhängenden Primer und kein Restriktionsverdau nötig. Die Transformation des Ligationsansatzes erfolgte auf chemisch-kompetente *E.coli* TOP10F'. Diese enthalten ein Ampicillin- und Kanamycin-Resistenzgen und die zur  $\alpha$ -Komplementation (*Blau-Weiß-Selektion mittels X-Gal*) nötige Deletion  $\phi 80\text{lacZ}\Delta\text{M15}$  im  $\beta$ -Galactosidase-Gen. Die transformierten Bakterien wurden auf X-Gal und Ampicillin haltigen Agar-Platten (2.7) ausplattiert, weiße Kolonien selektioniert und die DNA wurde präpariert (3.11.2).



**Abb. 4:** Schematische Darstellung des Vektors pCR 2.1. Der Ausschnitt zeigt die Basenfolge der „Multiple Cloning Site“ (MCS), die singulären Restriktionsschnittstellen sowie ein beliebiges, über TA Basenpaarung inseriertes PCR Produkt.

### 3.2 Bakterielle Proteinexpression

Die bakterielle Proteinüberexpression erfolgte in *E. coli* mit Hilfe des Vektors pMAL-c2 der Fa. New England Biolabs als Maltosebindungsprotein (MBP). Dazu wurde die gewünschte cDNA über Restriktionsschnittstellen der „Multiple Cloning Site“ (MCS) des Vektors kloniert (Abb. 5). Stromaufwärts der MCS trägt dieser Vektor das *malE* Gen von *E. coli*, gefolgt von einer Faktor Xa Protease Erkennungssequenz. Unter der Kontrolle des *tac*-Promotors erfolgt durch Induktion mit IPTG die Expression eines MBP-Fusionsproteins, das mit Hilfe der Faktor Xa Protease gespalten werden kann. Das im Vektor enthaltene Ampicillin-Resistenzgen (*Amp<sup>r</sup>*) ermöglicht die Selektion mittels Ampicillin.



**Abb. 5:** Schematische Darstellung des prokaryontischen Expressionsvektors pMAL-c2. Der Ausschnitt zeigt die Basenfolge der „Multiple Cloning Site“ (MCS), die singulären Restriktionsschnittstellen sowie die Aminosäuresequenz des Faktor Xa Spaltmotivs.

Die spezifische Bindung des MBP-Fusionsproteins an Amylose dient als affinitätschromatographischer, selektiver Reinigungs- und Konzentrationsschritt. Das an die Sepharose-Matrix gebundene Fusionsprotein kann durch Einsatz von Maltose-haltigem Puffer wieder eluiert und schließlich mittels Faktor Xa gespalten werden.



### 3.2.1 Präparation der bakteriellen Lysate: Anzucht, Induktion, Ernte und Lyse der Bakterienkultur

Zur Expression des gewünschten Maltosebindungsproteins wurde vorgewärmtes, glucosehaltiges LB-Medium mit Ampicillin versetzt und mit 1 % einer ÜNK aus rekombinanten *E. coli* BL-21 angeimpft. Die Proteinexpression wurde bei 37°C und 190 UpM bei einer  $OD_{600nm} = 0,7 - 0,8$  mit IPTG (*Endkonzentration: 0,2 mM*) induziert. Nach einer Inkubationszeit von 2h bei 37°C und 190 UpM wurde die Kultur 15 min im Eisbad gekühlt und 15 min mit  $6370 \times g$  bei 4°C zentrifugiert. Das Bakterienpellet einer 1000 ml Kultur wurde in 20 ml eiskaltem Bindungspuffer resuspendiert. Durch den Zusatz von 1 ml einer 25-fach konzentrierten Complete™ Protease-Inhibitoren-Lösung wurde der proteolytische Abbau des Fusionsproteins minimiert. Zur vollständigen Lyse der Bakterien wurde die Suspension über Nacht bei -20°C eingefroren, aufgetaut und mit dem Stab 4 x 15 sec mit einer Leistung von 40 W auf Eis ultrabeschallt. Die aufgeschlossenen Bakterien wurden 30 min mit  $9800 \times g$  bei 4°C pelletiert und schließlich das Lysat dekantiert.

### 3.2.2 Affinitätsreinigung des MBP-Fusionsproteins mittels Amylose-Harz

Pro Liter Bakterienkultur wurden 10 ml mit Bindungspuffer äquilibriertes Amylose-Harz 1 h bei 4°C auf dem Drehrad mit dem in 3.2.1 gewonnenen Bakterienlysate inkubiert („batch“-Verfahren). Das Harz wurde anschließend 3 x mit je 10 ml eiskaltem Bindungspuffer gewaschen. Zur Elution des MBP-Fusionsproteins wurde 2 x mit Elutionspuffer 10 min bei 4°C inkubiert und mittels Filtrationssäulchen (*PolyPrep Chromatography Columns der Fa. BioRad*) auf Eis eluiert.

### 3.2.3 Proteolytische Spaltung des Fusionsproteins mittels Faktor Xa

Das affinitätsgereinigte MBP-Fusionsprotein wurde 1:1 mit Bindungspuffer, der 1,0 % N-Octylglucosid enthielt, versetzt (*Endkonzentration: 0,5 % N-Octylglucosid*). Pro Liter Bakterienkultur wurden 25 µl Faktor Xa (25 U) zugegeben. Die Spaltung wurde bei 4°C für 24 h unter leichtem Kippschütteln durchgeführt. Gegebenenfalls wurde nach Analyse der Spalteffizienz mittels SDS-PAGE erneut unter denselben Bedingungen nachgespalten.

### 3.3 Ankonzentrieren und Umpuffern von Proteinlösungen

Zum Ankonzentrieren von Proteinlösungen durch Ultrafiltration wurden, abhängig vom Ausgangsvolumen, die im Folgenden aufgelisteten Konzentratoren der Fa. Millipore verwendet. Die Membranen der Konzentratoren sind für Proteine mit einer molaren Masse von mehr als 3000 Da undurchlässig. Zum Benetzen und Waschen der Membran wurden die Konzentratoren vor dem Gebrauch mit dem entsprechenden Puffer für 30 min zentrifugiert.

Konzentrator	Maximales Probenvolumen	Zentrifugationsbedingungen
Microcon-3	0,5 ml	max.: 14000 x g, 18°C
Centricon-3	2,0 ml	max.: 7500 x g, 18°C
Centriprep-3	15,0 ml	max.: 3000 x g, 18°C

Das Umpuffern von Proteinlösungen erfolgte mittels NAP<sup>TM</sup>-Molekularsiebsäulen (*Sephadex G-25*) der Fa. Pharmacia, die zuvor mit dem gewünschten Puffer äquilibriert wurden.

Säule	Maximales Probenvolumen	Elutionsvolumen
NAP <sup>TM</sup> - 5	0,5 ml	1,0 ml
NAP <sup>TM</sup> -10	1,0 ml	1,5 ml
NAP <sup>TM</sup> -25	2,5 ml	3,5 ml

### 3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

#### 3.4.1 Kolorimetrische Methode

Die Kolorimetrie wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration unter Verwendung des *Coomassie Plus Protein Assay Reagent* der Fa. Pierce durchgeführt. Das Prinzip der Proteinbestimmung beruht auf einem modifizierten Bradford-Coomassie-Farbstoff, der im sauren Medium an Proteine bindet und eine Blaufärbung hervorruft, die bei einer Wellenlänge von 595 nm zu einer intensiven Absorption führt. Zur Messung wurde ein definiertes Volumen der Proteinlösung mit einem definierten Reagenzvolumen vermischt und bei RT nach einem konstanten Zeitintervall im DU-40 Spectrophotometer der Fa. Beckman/Coulter

vermessen. Zur Auswertung wurde im Vorfeld unter gleichen Bedingungen eine Eichkurve mit Rinderserumalbumin als Standard aufgenommen. Die Proteinkonzentration wurde anhand der gemessenen Extinktion  $\epsilon(595)$  an der Eichkurve abgelesen.

### 3.4.2 Messung der UV-Absorption

Die Konzentration einer Proteinlösung kann durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm direkt bestimmt werden. Unter Berücksichtigung der Anzahl der Tryptophan-, Tyrosin- und Cystin-Reste im bekannten Protein, wurde der Proportionalitätsfaktor zwischen der gemessenen Extinktion  $\epsilon(280)$  und der Molarität nach folgender Formel berechnet (Pace et al., 1995):

$$\epsilon(280) \text{ (M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{)} = \underbrace{(\#W) \cdot 5500 + (\#Y) \cdot 1490 + (\#C-C) \cdot 125}_x \Rightarrow M = \frac{\epsilon(280)}{x} \text{ mol / l}$$

$(d = 1 \text{ cm})$

### 3.5 Präparative Proteinreinigung mittels FPLC (*Fast-Protein Liquid Chromatography*)

Die säulenchromatographische Proteinreinigung wurde mit dem ÄKTA™-FPLC Chromatographie-System der Fa. Amersham Pharmacia Biotech durchgeführt. Mit dem System wurden zahlreiche Kombinationen flüssigkeitschromatographischer Methoden zur Reinigung der gewünschten Proteine getestet. Dies waren

- Ausschluß- /Molekularsiebchromatographie (*SEC, size exclusion chromatography*)
- Ionenaustauschchromatographie (*IEX, ion exchange chromatography*)
- Hydrophobe Interaktionschromatographie (*HIC, hydrophobic interaction chromatography*)
- Affinitätschromatographie (*IMAC, immobilisierte Metallchelate Affinitätschromatographie*)

Die erhaltenen Chromatogramme wurden mit Hilfe der Gerätesoftware UNICORN™ 3.10 ausgewertet und bearbeitet. Vor dem Injizieren wurden die Proben stets mit Hilfe eines Spritzenfilters (*Millex-GV der Fa. Millipore*) der Porengröße 0,22 µm filtriert.

### 3.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Laemmli, 1970) in Mini-gelkammern der Fa. Keutz, Reiskirchen, 1 h mit einer Spannung von 150 V aufgetrennt. Die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und der Coomassie Färbelösung sind in 2.8 beschrieben.

Vor dem Auftragen wurden die Proteinproben mit Probenpuffer versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert und 1 min bei 13000 UpM zentrifugiert.

Nach dem Elektrophoreselauf wurden die Gele 20 min in Coomassie Färbelösung bei RT leicht geschwenkt, nach Abgießen der Lösung mit dH<sub>2</sub>O gewaschen und zum Entfärben zweimal ca. 3 min in dH<sub>2</sub>O in der Mikrowelle aufgeköcht. Mit höherer Sensitivität wurden Proteingele mit Silber gefärbt. Dies erfolgte nach Herstellerangaben mit dem *SilverQuest™ Silver Staining Kit* der Fa. Invitrogen.

Zusammensetzung des Trenngels, 12 % bzw. 15 % Acrylamid:

Komponenten	Volumen (12%)	Volumen (15%)
dH <sub>2</sub> O	3,3 ml	2,3 ml
30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid	4,0 ml	5,0 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml
10 % SDS	100 µl	100 µl
10 % APS	100 µl	100 µl
TEMED	4 µl	4 µl

Zusammensetzung des Sammelgels:

Komponenten	Volumen
dH <sub>2</sub> O	3,4 ml
30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid	830 µl
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	630 µl
10 % SDS	50 µl
10 % APS	50 µl
TEMED	5 µl

### 3.7 Elektroblothing

Der Transfer von im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteinen auf Nitrocellulose (NC)-Membran erfolgte nach dem „Halbtrockenblot“-Verfahren (Kyhse-Anderson, 1984). Für den „Western“-Blot wurden Polyacrylamidgel, NC-Membran und Filterpapier zwischen zwei Graphit-Plattenelektroden wie folgt geschichtet:

KATHODE
9 Filterpapiere, getränkt in Kathodenpuffer
SDS-Polyacrylamidgel
Nitrocellulosemembran, getränkt mit dH <sub>2</sub> O
3 Filterpapiere, getränkt mit Anodenpuffer II
6 Filterpapiere, getränkt mit Anodenpuffer I
ANODE

Die Übertragung erfolgte in Abhängigkeit von der Gelfläche bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm<sup>2</sup> Gel für 1h.

### 3.8 Nachweis Biotin-markierter Proteine auf Nitrocellulosemembran

Auf Nitrocellulose (NC)-Membran übertragene, Biotin-markierte Proteine wurden direkt über die hochaffine Bindung an Streptavidin-Peroxidase (POX) mittels Chemoluminiszenz, erzeugt durch die Oxidation von Luminol mittels POX unter Emission von Licht, nachgewiesen.

Um eine unspezifische Bindung von Antikörpern an die NC-Membran zu vermeiden, wurde der „Western“-Blot ü.N. mit 3% BSA in PBS abgesättigt. Anschließend wurde die Blot-Membran dreimal mit PBS/0,1% Tween-20 für 5 min gewaschen. Die Inkubation mit Streptavidin-Peroxidase, 1:4000 mit PBS/0,1% Tween-20 verdünnt, erfolgte für 1h bei RT. Es wurde dreimal mit PBS/0,1% Tween-20 und einmal nur mit PBS jeweils für 5 min gewaschen.

Der Nachweis der so markierten Proteine erfolgte mit dem *Super Signal<sup>®</sup> West Pico Chemiluminescent Substrate* der Fa. Pierce und anschließendem Belichten eines *Biomax MR* Röntgenfilms der Fa. Kodak.

### 3.9 Aufbewahren von Proteinlösungen

Gereinigte Proteinlösungen konnten mehrere Wochen bei 4°C unter Argon als Schutzgas aufbewahrt werden. Für eine längere Lagerzeit wurden Proteinlösungen in flüssigem Stickstoff für ca. 3 min schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

### 3.10 Zellkultur – Kultivierung von Insektenzellen

Sf9 Zellen (*aus Spodoptera frugiperda*) bzw. High-Five Zellen (*aus Trichoplusia ni*) wurden in 25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup> bzw. 162 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen der Fa. Costar ohne Begasung bei 27°C in 5 ml, 15 ml bzw. 25 ml Zellkulturmedium TC-100 (*mit 10 % FCS, 1 % Glutamin und 1 % Gentamycin*) kultiviert. Zum Passagieren wurden die nach 3 bis 4 Tagen zu einem konfluenten Monolayer gewachsenen Zellen mit einem sterilem Schaber vom Untergrund abgeschabt, in vorgewärmtem Zellkulturmedium suspendiert und im Verhältnis 1:5 auf neue Kulturflaschen verteilt. Die Zellen wurden 20 min bei 27°C inkubiert um abzusinken und festzuhaften, anschließend wurde das Zellkulturmedium erneuert.

### 3.11 Proteinexpression in Insektenzellen mittels rekombinanter Baculoviren

#### 3.11.1 Prinzip des BAC-TO-BAC™ Baculovirus Expressionssystems

Das BAC-TO-BAC™ System ist ein eukaryontisches Proteinexpressionssystem, bei dem rekombinante Bacmid-DNA durch sequenzspezifische Transposition in *E. coli* erzeugt wird (Luckow et al, 1993). Der Begriff Bacmid-DNA bezeichnet eine in *E. coli* replikationsfähige Form des Baculovirus-Genoms. Nach Transfektion der rekombinanten Bacmid-DNA in Insektenzellen entstehen Baculoviren, die das Zielprotein überexprimieren, das unter der Kontrolle des hochaktiven Polyhedrin Promotors steht.

Die Klonierung des Zielgens erfolgt über die „Multiple Cloning Site“ (MCS) des Vektors pFASTBAC1 (Abb. 6). Die MCS liegt direkt hinter dem starken Polyhedrinpromotor aus dem *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus (*AcNPV*). Im Donorplasmid pFASTBAC1 sind die MCS, Polyhedrinpromotor (*pPolh*), Gentamycin-Resistenzgen (*Gm<sup>r</sup>*) und SV-40



Der Zellkulturüberstand dient als Virus-Stock zur Infektion neuer Sf9-Zellen, in denen das gewünschte Zielprotein überexprimiert wird. Die Virusmenge wird mittels Plaque-Test bestimmt (3.11.5).

Schließlich folgt die Analyse der Insektenzellen und des Zellkulturüberstands auf Proteinebene mit dem Ziel der Identifikation, Isolierung und Reinigung des Zielproteins.

### **3.11.2 Sequenzspezifische Transposition zur Erzeugung rekombinanter Bacmid-DNA**

Die Klonierung des Zielproteins in den Vektor pFASTBAC1 erfolgte nach den unter 3.1 beschriebenen Methoden.

Zur sequenzspezifischen Transposition in *E. coli* wurden 100 µl kompetente *E. coli* DH10BAC auf Eis aufgetaut und in ein 15 ml Polycarbonatröhrchen überführt. Es wurden 1 ng des rekombinanten Plasmids zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Die Transformation der DNA erfolgte durch einen Hitzeschock für 45 sec bei 42°C, dem sich eine Inkubation von 2 min auf Eis anschloß. Zur Transposition und Ausbildung der Antibiotika-Resistenzen wurden 900 µl SOC-Medium zugegeben und 4 h bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. 10 µl, 100 µl und der Rest wurden auf LB-Bacmid Agar-Platten ausgestrichen.

Nach 2d Inkubation bei 37°C erfolgte die erste blau/weiß Selektion. Große, weiße Kolonien wurden gestochen, um 2 ml SOC-Medium zu inokulieren. Nach Inkubation ü. N. bei 37°C mit 200 UpM auf einem Schüttelinkubator schloß sich eine zweite blau/weiß Selektion an.

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte wie in 3.1.12 beschrieben.

### **3.11.3 Transfektion rekombinanter Bacmid-DNA**

Pro Transfektionsansatz wurden konfluente Insektenzellen im Verhältnis 1:2 in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgesät und zum Absetzen 20 min bei 27°C inkubiert.

10 µl der in 3.11.2 präparierten DNA wurden mit 200 µl TC-100 Zellkulturmedium (*ohne FCS, ohne Antibiotikum*) gründlich gemischt (*Lösung A*). In einem Polycarbonatröhrchen wurden 10 µl Cellfectin mit 200 µl Medium (*ohne FCS, ohne Antibiotikum*) ebenfalls gründlich vermischt (*Lösung B*). Die Lösungen A und B wurden zusammengegeben und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 1,6 ml TC-100 Zellkulturmedium (*ohne FCS, ohne Antibiotikum*) zugegeben und vorsichtig vermischt.



Das Medium der zuvor passagierten Insektenzellen wurde abgenommen und zum Waschen für 10 min durch 5 ml Medium (*ohne FCS, ohne Antibiotikum*) ersetzt. Nach vollständigem Abnehmen des Mediums wurden die Zellen mit 2 ml Transfektionsansatz überschichtet und 5 h bei 27°C inkubiert.

Schließlich wurde der Überstand abgenommen und durch 5 ml TC-100 (*mit 10 % FCS, 1 % Glutamin und 1 % Gentamycin*) ersetzt.

Nach 4 Tagen Inkubation bei 27°C hatten sich rekombinante Baculo-Viren gebildet. Der Zellkulturüberstand wurde abgenommen und für 5 min bei 4°C mit 1000 x g zum Entfernen von abgelösten Zellen zentrifugiert.

Aufgrund der hohen Stabilität von Baculoviren können Viruslösungen bei 4°C mindestens für ein Jahr gelagert werden.

#### **3.11.4 Herstellen von hochtitrigen Virusstammlösungen**

Um hohe Virustiter zu erhalten, wurde das Medium von 80 % konfluenten Sf9-Zellen abgenommen und mit 3 ml bzw. 6 ml Virussuspension (*für 75 cm<sup>2</sup> bzw. 162 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen der Fa. Costar*) infiziert. Dazu wurden die Flaschen 2 h bei 27°C unter gelegentlich leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und 15 ml bzw. 25 ml Zellkulturmedium TC-100 (*mit 10 % FCS, 1 % Glutamin und 1 % Gentamycin*) zugegeben. Nach 6 Tagen bei 27°C wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und für 5 min bei 4°C mit 1000 x g zum Entfernen von abgelösten Zellen zentrifugiert und bei 4°C aufbewahrt (3.11.3).

#### **3.11.5 Plaquetest zur Bestimmung des Virustiters**

Zur Bestimmung des Virustiters wurde nach Abschaben und Resuspendieren von konfluent gewachsenen Sf9-Zellen die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Für einen Plaque-Test wurden pro Vertiefung ( $\varnothing = 3,3 \text{ cm}$ ) einer 6er-Zellkulturplatte der Fa. Costar  $1,2 \times 10^6$  Zellen ausgesät. Nach dem Absitzen der Zellen für 1 h bei 27°C wurde das Medium abgenommen und mit je 500 µl einer Verdünnungsreihe der Virussuspension ( $10^{-3}$  bis  $10^{-7}$ ) infiziert. Um das Inokulum gleichmäßig zu verteilen, wurde die Platte auf einem Kippschüttler während der einstündigen Infektion bei 27°C vorsichtig geschwenkt.

Für die erste Agarschicht wurden die infizierten Zellen mit je 2 ml Plaque-Agar A (2.7) vorsichtig überschichtet. Nach Erstarren des Agars wurden die Platten 3 d bei 27°C inkubiert. Analog zur ersten folgte eine zweite Agarschicht und erneute Inkubation für 3 d bei 27°C. Die dritte Agarschicht zur Färbung der lebenden Zellen erfolgte durch Überschichten mit je 2 ml Plaque-Agar B (2.7) und weitere Inkubation für 1 – 2 d bei 27°C.

Die nicht gefärbten Plaques wurden schließlich ausgezählt und der Virustiter bestimmt.

### **3.11.6 Infektion von Insektenzellen: Rekombinante eukaryontische Proteinexpression**

Zur eukaryontischen Proteinexpression in Insektenzellen mittels rekombinanter Baculoviren wurde das Medium von 80 % konfluenten Sf9-Zellen abgenommen und die Zellen 5 min mit TC-100 (*ohne FCS, mit 1 % Glutamin und 1 % Gentamycin*) gewaschen, um möglichst serumfrei zu exprimieren. Mit einer M.O.I. (*multiplicity of infection*) von 5 wurde anschließend mit einer hochtitrigen Virussuspension infiziert. Dazu wurden die Flaschen 2 h bei 27°C unter gelegentlich leichtem Schwenken inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und schließlich 15 ml bzw. 25 ml (*für 75 cm<sup>2</sup> bzw. 162 cm<sup>2</sup> Flaschen*) Zellkulturmedium TC-100 (*ohne FCS, mit 1 % Glutamin und 1 % Gentamycin*) zugegeben und bei 27°C inkubiert.

6 Tage nach Infektion wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und für 5 min bei 4°C mit 1000 x g zum Entfernen von abgelösten Zellen zentrifugiert. Zum Reinigen von Proteinen aus dem Zellkulturüberstand wurde die Lösung ultrazentrifugiert (*SW-28, 80000 x g, 4°C, 75 min*), um die Viren zu pelletieren.

### **3.11.7 Lyse von Insektenzellen**

Die Lyse von Insektenzellen erfolgte durch zweifaches Einfrieren (*Trockeneis/Ethanol*) und Auftauen (*Wasserbad, RT*) sowie einer Ultraschallbehandlung auf Eis, 3 mal für 15 sec bei 20 W mit dem Stab. Zum Pelletieren der Zelltrümmer wurde 15 min bei 4°C mit 12000 x g zentrifugiert.

### 3.12 Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

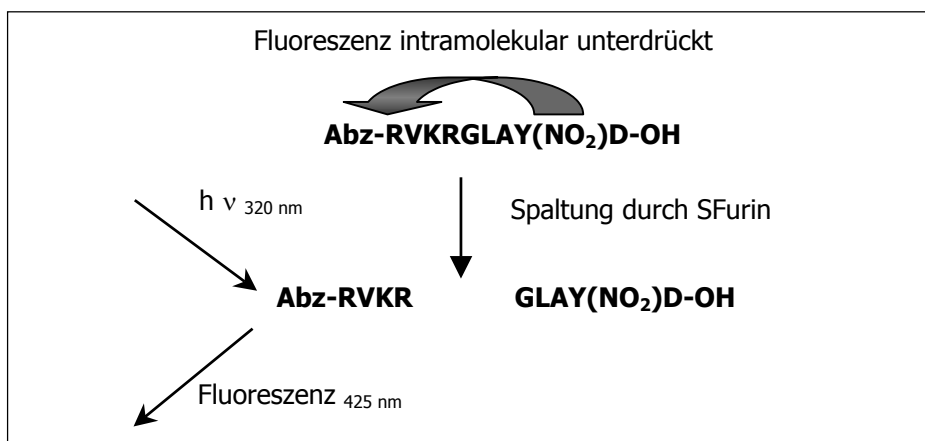
Zur fraktionierten Fällung der Proteine des Zellkulturüberstands nach Baculovirus-Infektion (3.11.6), wurde dem Überstand unter ständigem Rühren aus einer Bürette gesättigte  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung zugetropft, bis eine gewünschte Ammoniumsulfat-Konzentration erreicht war. Diese Lösung wurde ü.N. bei 4°C stehengelassen. Der gebildete feine, weiße Niederschlag wurde 20 min bei 4°C mit 10000 x g pelletiert und der Überstand anschließend vorsichtig dekantiert. Zu diesem Überstand wurde erneut gesättigte  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung getropft, bis eine höhere Ammoniumsulfat-Konzentration als zuvor erreicht war. Es wurde erneut ü.N. bei 4°C stehengelassen, zentrifugiert und dekantiert. Meist wurde noch ein drittes Mal gefällt, wobei typische Ammoniumsulfat-Endkonzentrationen bei 45%, 55% und 75% Sättigung lagen.

Die erhaltenen Pellets wurden sofort wieder in 100 mM HEPES, pH 7,0 gelöst und mittels chromatographischer Methoden präparativ gereinigt (3.5).

### 3.13 Enzymaktivitäts-Test

Der Enzymaktivitätstest für SFurin basiert auf der Spaltung des Furin-Substrats Abz-RVKRGLAY(NO<sub>2</sub>)D-OH (Anglikar et al, 1995). Dieses modifizierte Nonapeptid wird von Furin hinter dem Spaltmotiv RVKR spezifisch gespalten. Bei einer Wellenlänge  $\lambda = 320$  nm können die  $\pi$ -Elektronen des Aminobenzoylrests (*Elektronendonator*) in einen angeregten Zustand überführt werden. Die Rückkehr dieser angeregten Elektronenzustände in den Grundzustand geht einher mit der Emission von Licht der Wellenlänge  $\lambda = 425$  nm. Die Probe fluoresziert. Im ungespaltenen Zustand hingegen verhindert der Nitrotyrosinrest (*Elektronenakzeptor*) ein Fluoreszieren des Substrats unter den zuvor genannten Bedingungen. Die Fluoreszenz des intakten Substrats ist intramolekular unterdrückt (Abb. 7).

Die gemessene Fluoreszenz ist also ein direktes Maß für die Furin-Aktivität einer Probe.



**Abb. 7:** Das Schema zeigt die Spaltung des Substrats **Abz-RVKRGLAY(NO<sub>2</sub>)D-OH** durch **Furin**. Das erzeugte Spaltprodukt **Abz-RVKR** fluoresziert bei der Anregung mit Licht der Wellenlänge 320 nm. Die Fluoreszenz kann bei einer Wellenlänge von 425 nm detektiert werden.

### 3.13.1 Furin-Aktivitätsmessungen ohne Inhibitor

Standardmeßbedingungen (500 µl Ansatz):

Komponenten	Volumen
Enzymprobe ( <i>SFurin</i> )	12,5 µl
Enzymaktivitätstest-Puffer 100 mM HEPES, pH 7,0 2 mM CaCl <sub>2</sub> 0,5 % Triton X-100 1 mM Mercaptoethanol	485,0 µl
Substrat 1 mM Abz-RVKRGLAY(NO <sub>2</sub> )D-OH	2,5 µl

Der Ansatz wurde eine definierte Zeit bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Zur Reproduzierbarkeit der gewünschten Reaktionszeit wurden die Ansätze auf Eis pipettiert und bis zur Messung kurzzeitig auf Eis gehandhabt.

Zur Messung der spezifischen Furin-Aktivität wurde der Ansatz 1:10 mit dH<sub>2</sub>O verdünnt, in eine 500 µl Quarzglasküvette gefüllt und am LS-5B Luminescence Spectrometer der Fa. Perkin Elmer vermessen. Als Referenz-Wert wurde Puffer mit Substrat unter den gleichen Versuchsbedingungen vermessen.

Den gemessenen Fluoreszenzwerten wurde die Einheit *Emission Units [EU]* zugeordnet. Die Fluoreszenz in [EU] ist proportional zur Furin-Aktivität.

### 3.13.2 Furin-Aktivitätsmessungen mit Inhibitor

Standardmeßbedingungen (50 µl Ansatz):

Komponenten		Volumen
Enzymprobe ( <i>SFurin</i> )		1,25 µl
Enzymaktivitätstest-Puffer 100 mM HEPES, pH 7,0 2 mM CaCl <sub>2</sub> 0,5 % Triton X-100 1 mM Mercaptoethanol		45,75 µl
Inhibitor	(verschiedener Konzentration)	0,5 µl
Substrat	Abz-RVKRGLAY(NO <sub>2</sub> )D-OH (verschiedener Konzentration)	2,5 µl

Vor Zugabe des Substrats wurde der Ansatz (*Enzym, Puffer und Inhibitor*) 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Substrat zugegeben und 15 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Um die Reaktionszeit möglichst konstant zu halten, wurden die Ansätze auf Eis pipettiert und bis zur Messung kurzzeitig auf Eis gehandhabt.

Zur Messung der spezifischen Furin-Aktivität wurde der Ansatz 1:10 mit dH<sub>2</sub>O verdünnt, in eine 500 µl Quarzglasküvette gefüllt und am LS-5B Luminescence Spectrometer der Fa. Perkin Elmer vermessen. Als Referenz-Werte wurden A) Puffer mit Substrat und B) der Ansatz ohne Inhibitor unter den gleichen Versuchsbedingungen vermessen.

## 3.14 Kristallisation von Proteinen

### 3.14.1 Proteinkristalle

Proteine sind Makromoleküle, die in ihrer Struktur sehr dynamisch sind. Im Gegensatz zu anorganischen und einfachen organischen Substanzen, die meist aus Lösung, aus der Schmelze oder durch Sublimation kristallisieren, gelingt die Kristallisation von Proteinen nur aus wässriger Lösung. In allen Kristallstrukturen, so auch in Proteinen, sind die Moleküle in einem sich regelmäßig wiederholenden, dreidimensionalen Gitter angeordnet. Im Gegensatz zu der allgemeinen Vorstellung ein Kristall sei hart und habe eine starre Struktur, wie es zweifellos von Achat bis Zirkon der Fall ist, sind Proteinkristalle von weicher, gelatinöser Konsistenz. Grund dafür ist ihr hoher Wassergehalt von durchschnittlich 40 bis 60 % ihres

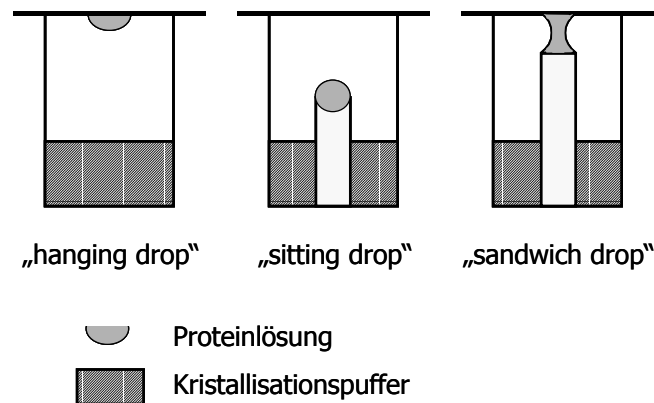
Volumens. Daher ist für die strukturelle Integrität eines Proteins *in vivo* als auch im Proteinkristall ein wäßriges Lösungsmittel unabdingbar. Die native Konformation eines Proteins in Lösung bleibt im Proteinkristall erhalten, da sie sich im Kristall quasi in Lösung befindet. Es wurde gezeigt, daß Kristalle desselben Proteins, von denen mehrere unterschiedliche Kristallpackungen gefunden wurden, eine nahezu identische Konformation besitzen. Der beste Beweis für die native Struktur eines kristallinen Proteins ist seine enzymatische Aktivität, die in den meisten Fällen auch im Kristall unbeeinflußt bleibt (Voet, 1992; Boehm, 1996).

### **3.14.2 Kristallisation aus übersättigten Lösungen**

Die Kristallisation von Proteinen erfolgt aus einer metastabilen, übersättigten Lösung. Das Überschreiten des Sättigungspunktes kann auf verschiedene Weise erfolgen. Die Lösung kann durch langsames Entfernen von Wasser konzentriert werden. Durch Absenken der Temperatur kann die Löslichkeit eines Moleküls im allgemeinen verringert und der Sättigungspunkt überschritten werden. Die Zugabe eines zweiten Lösungsmittels, in dem das Protein schlechter löslich ist, führt ebenso wie die Wahl eines pH-Wertes, bei dem das Protein geladen ist und ionische Wechselwirkungen ausbilden kann, zum Überschreiten des Sättigungspunktes. Schließlich kann dem Protein durch Aussalzen Wasser entzogen werden, wobei das Salz selbst eine Hydrathülle ausbildet und damit das dem Protein zur Verfügung stehende Wasser verringert (zur Übersicht: McPherson, 1990; Lottspeich, 1998).

### **3.14.3 Proteinkristallisation durch Gasphasendiffusion, die Methode „hanging drop“**

Aufgrund der meist begrenzten Proteinmenge und der großen Zahl an Kristallisationsansätzen, sollte das Volumen eines Versuchs möglichst gering und dennoch gut zu handhaben sein. Basierend auf dem Prinzip der Gasphasendiffusion werden drei Mikrokristallisationsverfahren unterschieden: Die „hanging drop“, „sitting drop“ und „sandwich drop“ Methode (Abb. 8).



**Abb. 8: Schematische Darstellung dreier Mikrotechniken zur Kristallisation von Proteinen.** Bei der „hanging drop“-Methode hängt der Tropfen an einem Deckplättchen über dem Pufferreservoir, in der „sitting drop“-Methode sitzt der Tropfen in eigens dafür vorgesehenen Platten auf einem Stempel, während im „sandwich drop“-Verfahren der Tropfen zwischen einem Stempel und einem Deckglas aufgespannt ist (Ducruix und Giegé, 1992).

In dieser Arbeit wurde die Methode des „hanging drop“ angewandt. Hierzu wurden jeweils 500  $\mu$ l Kristallisationspuffer in 24 Reservoirs einer Zellschale pipettiert. Auf ein rundes 22 mm Glasdeckplättchen wurde 1  $\mu$ l des Kristallisationspuffers pipettiert und mit 1  $\mu$ l Proteinlösung vermischt. Das Deckplättchen wurde umgehend mit dem Tropfen nach unten auf den mit Schliff-Fett behandelten Rand eines Reservoirs gesetzt.

Die Pufferkonzentration der eingesetzten Proteinlösung muß um mehrere Zehnerpotenzen geringer sein als die der Kristallisationspuffer. Nach dem Vermischen der Proteinlösung mit dem Kristallisationspuffer ist die Pufferkonzentration im Tropfen nur annähernd halb so groß wie die des Reservoirs. Der mit Schliff-Fett abgedichtete Raum bildet ein abgeschlossenes System, in dem Wassermoleküle aus dem Tropfen über die Gasphase in den höherkonzentrierten Reservoir-Puffer diffundieren. In mehreren Tagen konzentriert sich das Protein im Tropfen an, bis ein Gleichgewichtszustand erreicht ist. Unter dem Mikroskop, mit dem die Ansätze täglich begutachtet wurden, lassen sich prinzipiell drei Phänomene beobachten: Klare Tropfen, bei denen das Protein vollständig in Lösung bleibt, Präzipitate, das Protein ist ausgefallen (*amorph*) und Kristalle, möglicherweise in verschiedenen Kristallformen. Die Bedingungen unter denen Kristallwachstum erreicht wurde, dienen als Ausgangspunkt zur Variation der Pufferzusammensetzung, um das Kristallwachstum positiv zu beeinflussen.

## 4 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit untersucht die Hemmung der Enzymaktivität von *Spodoptera frugiperda* Furin (*SFurin*). Hierfür mußte ein Expressions- und Reinigungsverfahren einer rekombinant exprimierten, membranankerlosen Form von katalytisch aktivem SFurin etabliert und deren enzymatische Eigenschaften bestimmt werden. Es wurden mehrere Peptide und Peptidderivate als potentielle Inhibitoren *in vitro* charakterisiert.

Außerdem wurde die Frage gestellt, ob auch die Prodomäne von SFurin unter diesen Bedingungen als Inhibitor fungiert. Es wurde ein Expressions- und Reinigungsverfahren für die Prodomäne von SFurin ausgearbeitet. Die gereinigte Proteindomäne wurde bezüglich ihrer Hemmwirkung getestet und mit anderen, zum Teil publizierten Inhibitoren verglichen.

### 4.1 Klonierung, Expression und Reinigung von katalytisch aktivem SFurin

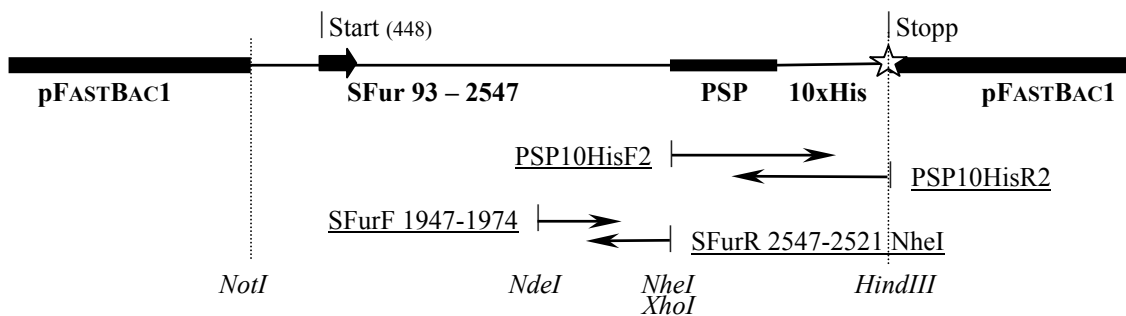
#### 4.1.1 Klonierung der katalytischen Domäne von SFurin in den Vektor pFASTBAC1

Ziel der Klonierung war die Insertion des für die Aminosäuren 1-700 kodierenden Genabschnitts von *Spodoptera frugiperda* Furin in den Vektor pFASTBAC1. Als Matrize diente das Konstrukt pBluescript SK/sfur 93-6385 (*Klon 5*) (Michael Cieplik, Marburg 1996), das den gesamten offenen Leserahmen des SFurin Gens enthält (ANHANG). Eine zusätzliche Basensequenz am Ende des klonierten Gens kodierte für eine Proteasen-Spaltsequenz (*PSP*)<sup>3)</sup>, für ein Peptid aus 10 Histidin und ein Stopp-Codon (Abb. 9).

Das gewünschte Konstrukt wurde in mehreren Schritten kloniert. Zuerst wurde der Vektor pFASTBAC1 modifiziert. Die beiden 93 Basen langen Oligonukleotide PSP10HisF2 und PSP10HisR2 sind zueinander komplementär und enthalten in 5'→3' Richtung die Basensequenz für eine *NheI* Restriktionsschnittstelle, eine PSP-Spaltsequenz, zehn Histidine und ein Stopp-Codon. Flankiert ist dieser Bereich von einer *XhoI*-Schnittstelle am 5'-Ende und einer *HindIII*-Schnittstelle am 3' Ende (2.3). Beide Oligonukleotide wurden hybridisiert und anschließend mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *HindIII* verdaut (3.1.5).

<sup>3)</sup> Es handelt sich um die Aminosäuresequenz L-E-V-L-F-Q-G-P, die von der PreScission™ Protease (*PSP*) zwischen Q und G spezifisch gespalten wird (Cordingly et. al., 1990). Die PSP ist ein Fusionsprotein aus der 3C Protease des humanen Rhinovirus Typ 14 und der Glutathion S-Transferase (Walker et. al., 1994).





**Abb. 9:** Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie des SFurin Konstrukts in pFASTBAC1. Die Bezeichnungen der Gensegmente sind fettgedruckt, die der verwendeten Oligonukleotide unterstrichen (  $\text{---}\rightarrow$  ) und die Abkürzungen der Restriktionsendonukleasen kursivgedruckt.

Nach Verdau des Vektors pFASTBAC1 mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *HindIII* wurde das zuvor erzeugte Fragment in den Vektor ligiert, in *E. coli* transformiert und die Plasmid-DNA isoliert (3.1.9 – 3.1.12). Der neue Vektor trägt die Bezeichnung pFASTBAC1-PSP-10His.

Als Zweites wurde der Vektor pBluescript SK/sfur 93-6385 (*Klon 5*) mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *NdeI* präparativ verdaut (3.1.5). Dadurch wurde das Gensegment des N-terminalen Fragments von SFurin, Nukleotid 93 bis Nukleotid 1962 inklusive 15 vektoriellen Nukleotiden am 5' Ende, erzeugt (ANHANG).

Die Nukleotide 1947 bis 2547 von SFurin wurden, ausgehend von dem Vektor pBluescript SK/sfur 93-6385 (*Klon 5*) und unter Verwendung der Primer SFurF 1947-1974 und SFurR 2547-2521 *NheI* mittels PCR amplifiziert (3.1.3). Am 5' Ende des 600 Nukleotide langen Fragments befand sich eine *NdeI*-, und am 3' Ende eine *NheI*-Restriktionsschnittstelle. Das generierte PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *NheI* verdaut.

Schließlich wurde der neue Vektor pFASTBAC1-PSP-10His mit den Restriktionsendonukleasen *NotI* und *NheI* geschnitten und mit den Genfragmenten 93 – 1962 (*NotI* und *NdeI* verdaut) und 1947 – 2547 (*NdeI* und *NheI* verdaut) ligiert (3.1.9).

Nach Transformation des neuen Konstrukts in *E. coli* wurde die Plasmid-DNA isoliert (3.1.10 – 3.1.12). Die DNA mehrerer Klone wurde mit Hilfe der Oligonukleotide BAC 1F 3955-3975 und BAC 1R 4242-4221 sequenziert (3.1.13) und das Plasmid eines mutationsfreien Klons zur Erzeugung rekombinanter Baculoviren eingesetzt (4.1.2).

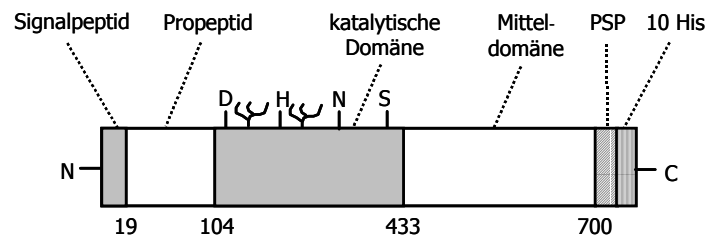
#### 4.1.2 Herstellung rekombinanter Baculoviren

Die in 4.1.1 isolierte DNA wurde zur Herstellung rekombinanter Baculoviren eingesetzt. Zuerst erfolgte die sequenzspezifische Transposition in *E. coli* DH10BAC, um rekombinante Bacmid-DNA zu erzeugen (3.11.2). Die isolierte Bacmid-DNA wurde zur Transfektion von Sf9-Insektenzellen eingesetzt (3.11.3).

Durch Infektion von Sf9-Zellen mit den zuvor erzeugten Baculo-SFur Viren wurden 250 ml einer hochtitrigen Virusstammlösung hergestellt (3.11.4). Mittels Plaque-Test wurde ein Virustiter von  $3,7 \times 10^8$  PFU / ml bestimmt (3.11.5).

#### 4.1.3 Expression von katalytisch aktivem SFurin mit Hilfe des BAC-TO-BAC™ Baculovirus Expressionssystems

Das in 4.1.1 klonierte SFurin-Konstrukt wurde im Baculovirus Expressionssystem als ein 718 Aminosäuren langes Vorläuferprotein synthetisiert (Abb. 10). Im Vergleich zum nativen Protein (Abb. 3) fehlt die gesamte cysteinreiche Domäne, der Membrananker und die zytoplasmatische Domäne.



**Abb. 10: Schematische Darstellung des rekombinanten SFurins.** Es besteht aus den ersten 700 Aminosäuren des nativen SFurins (*Signalpeptid, Prodomäne, katalytische Domäne und Mitteldomäne*) sowie einem 18 Aminosäuren langen C-terminalen Rest, der eine PreScission™ Protease (PSP) Spaltsequenz (*LEVLFGQP*) und zehn aneinandergereihte Histidine enthält. Die Zahlen geben jeweils die Position der letzten Aminosäure einer Domäne an (ANHANG).

Die Infektion von Insektenzellen mit rekombinanten Baculo-SFur Viren sollte aufgrund des Signalpeptids zur Sezernierung des Proteins führen. Es war zu erwarten, daß ein korrekt prozessiertes Protein entsteht, das glycosyliert ist und dessen Prodomäne im Laufe der Reifung katalytisch abgespalten wird. Das katalytisch aktive Protein ist 614 Aminosäuren lang (*incl. des 18 Aminosäuren langen C-terminalen Peptids*) und besitzt ein errechnetes Molekulargewicht von ca. 68 kDa. Wird das Protein an den potentiellen Glycosylierungs-

stellen in Position 196 und 242 (ANHANG) mit Oligosacchariden besetzt, erreicht das Protein ein Molekulargewicht von ca. 70 kDa (4.1.5, Abb. 18).

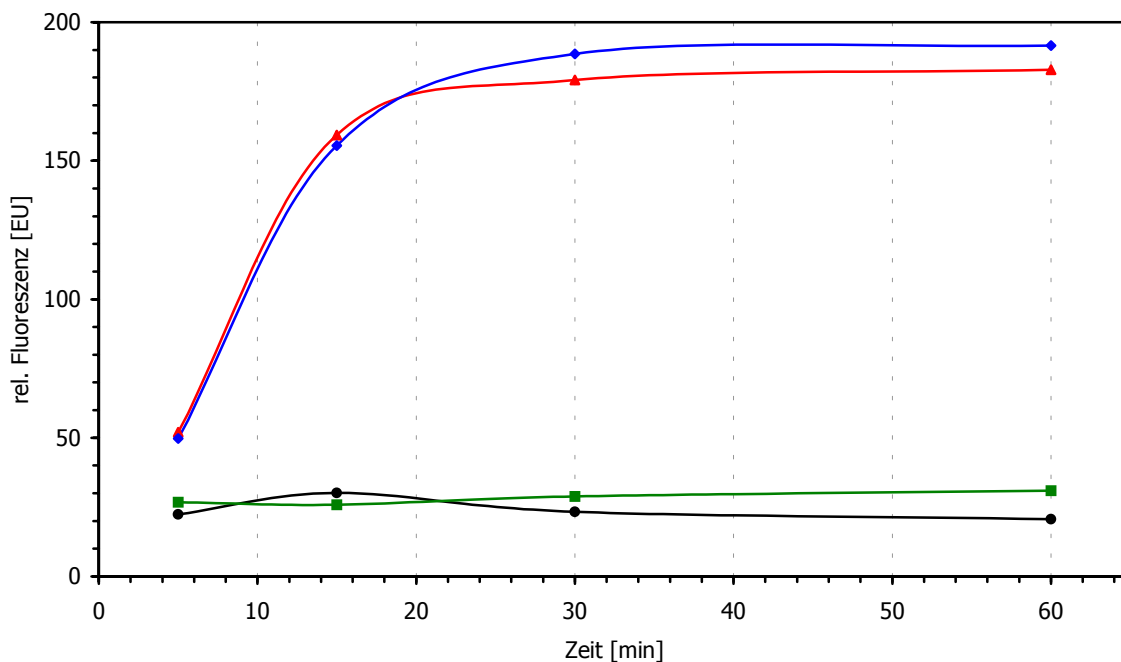
#### **4.1.3.1 Enzymaktivität des Zellysats und des Zellkulturüberstands von Baculo-SFur infizierten Sf9-Zellen**

Um die Expression von SFurin zu testen wurden Sf9-Zellen (*eine 162 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit  $8 \times 10^7$  Zellen*) mit einer M.O.I. von 5 mit Baculo-SFur Virusstammlösung infiziert (4.1.2) und für 5 Tage bei 27°C inkubiert (3.11.6). Der Zellkulturüberstand wurde abgenommen und zum Entfernen von abgelösten Zellen für 5 min bei 4°C mit 1000 x g zentrifugiert. Die infizierten Zellen wurden in Insektenmedium (*ohne FCS*) resuspendiert, lysiert und durch Zentrifugation von Zelltrümmern befreit. Die Proteine des Zellüberstands und des Lysats wurden mit einer Endkonzentration von 75 % mit Ammoniumsulfat gefällt und anschließend in jeweils 1,5 ml 100 mM HEPES, 10 mM NaCl und 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,0 gelöst (3.12).

Mit Hilfe des Enzymaktivitäts-Tests (3.13.1) wurde die SFurin-Aktivität untersucht. Im Zellysatz wurde eine Aktivität von 30 EU, im Zellüberstand von 1860 EU pro 1,5 ml resuspendierte Proteine erhalten. Im Zellysatz konnte somit keine signifikante SFurin-Aktivität nachgewiesen werden. Die geringe Aktivität ist wahrscheinlich auf das endogene SFurin der Sf9-Zellen zurückzuführen. Im Zellkulturüberstand hingegen wurde hohe SFurin-Aktivität gemessen. Dies war zu erwarten, da das exprimierte SFurin aufgrund seiner Signalsequenz zur Zelloberfläche transportiert wird. Da die Transmembrandomäne fehlt, kann das Protein nicht in zelluläre Membranen inserieren. Aufgrund der Deletion des cytoplasmatischen Anteils fehlen sämtliche Lokalisationssignale, die im nativen Protein zur Akkumulation des Proteins im *trans*-Golgi-Netzwerk führen würde (Schäfer et al., 1995, Teuchert et al., 1999).

#### 4.1.3.2 Vergleich der Enzymaktivität von Baculo-Wildtyp Virus infizierten Sf9-Zellen zu Baculo-SFur Virus infizierten Sf9- und High-Five™ Zellen

Die beiden Insektenzelllinien Sf9 aus *Spodoptera frugiperda* und High-Five™ aus *Trichoplusia ni* wurden parallel mit einer M.O.I. von 5 mit Baculo-SFur Virusstammlösung infiziert. Als Kontrolle wurden Sf9-Zellen unter denselben Bedingungen mit Baculo-Wildtyp Virus infiziert. Die drei Ansätze wurden 5 Tage bei 27°C inkubiert (3.11.6). Anschließend wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und zum Entfernen von abgelösten Zellen zentrifugiert. Die Überstände wurden mit einer Endkonzentration von 75 % mit Ammoniumsulfat gefällt, die Pellets in gleichen Volumina 100 mM HEPES, 10 mM NaCl und 2 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,0 gelöst (3.12) und die SFurin-Aktivität gemessen (3.13.1). Die Meßergebnisse sind in Abb. 11 dargestellt.



**Abb. 11: Vergleich der SFurin-Aktivität in Zellkulturüberständen von Baculo-SFur Virus infizierten Sf9-Zellen** ▲ **mit High-Five™-Zellen** ◆ . Als Kontrolle ist die Aktivität von Zellkulturüberständen Baculo-Wildtyp-Virus infizierter Sf9-Zellen dargestellt ■ und als Referenz wurde ein Ansatz ohne Enzym vermessen (*Substrat mit Puffer*) ● .

Abb. 11 zeigt, daß in Zellkulturüberständen von Baculo-SFur Virus infizierten Insektenzellen hohe Enzymaktivität vorhanden ist (*roter und blauer Graph*). Ein Unterschied in der Furin-Aktivität der Zellkulturüberstände von *Spodoptera frugiperda* zu *Trichoplusia ni* Zellen, die

mit rekombinanten Baculo-SFur Viren infiziert worden waren, wurde nicht beobachtet. Beide zeigen gleich hohe Enzymaktivität (*roter und blauer Graph*). Der zeitliche Verlauf der gemessenen Fluoreszenz zeigt, daß das Substrat nach 20-30 min bereits vollständig umgesetzt war. Zellkulturüberstände von Baculo-Wildtyp infizierten Sf9-Zellen zeigen keine Furin-Aktivität (*grüner Graph*). Der grüne Graph und der schwarze Graph (*Referenz ohne Enzym*) verlaufen annähernd gleich.

Da Sf9-Zellen sich adhärent schneller vermehrten und weniger empfindlich waren als High-Five™-Zellen, sie aber keine unterschiedlichen Enzymaktivitäten zeigten, wurden im Folgenden Sf9-Zellen zur Infektion mit Baculo-SFur Viren eingesetzt, um rekombinantes SFurin zu gewinnen.

#### 4.1.4 Proteinexpression und präparative Reinigung von katalytisch aktivem SFurin

Zur präparativen Enzymreinigung wurden Sf9-Zellen (*34 Zellkulturflaschen der Größe 162 cm<sup>2</sup>*) mit rekombinantem Baculo-SFur Virus beimpft (3.11.6). Nach Zentrifugation wurde der Zellkulturüberstand (*850 ml*) fraktioniert ammoniumsulfatgefällt und die gefällten Proteine in unterschiedlichen Volumina HEPES-Puffer wieder gelöst (3.12). Es wurde die Proteinmenge bestimmt und die Furin-Aktivität gemessen (3.4.1 und 3.13.1). Die Ergebnisse sind in Tab. 3 zusammengestellt.

<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>- Fällung</b>	<b>Volumen [ml]</b>	<b>Konzentration [µg/ml]</b>	<b>Total-Protein [µg]</b>	<b>SFurin-Aktivität [EU]</b>
45 %	127	280	36800	1110
55 %	30	330	9900	960
75 %	75	350	26300	1700

**Tab. 3: Vergleich der Volumina nach Resuspension, Proteinkonzentration, Proteinmenge und SFurin-Enzymaktivität nach fraktionierter Ammoniumsulfatfällung.** Diese Daten sind die Grundlage zur Berechnung der spezifischen Anreicherung von SFurin in den folgenden Reinigungsschritten (ANHANG: Übersicht der Reinigung).

#### 4.1.4.1 Etablierung der Reinigung von katalytisch aktivem SFurin mittels flüssigkeits-chromatographischer Trennmethoden

Nach Ammoniumsulfatfällung des Zellkulturüberstands Baculo-SFur Virus infizierter Sf9-Zellen wurden unterschiedliche Reinigungsstrategien mittels FPLC durchgeführt (3.5).

Zuerst wurde versucht, das Protein mittels Affinitätschromatographie anzureichern. Dazu wurde die Proteinlösung durch Ausschlußchromatographie (*HiPrep 26/10 Desalting Säule*) entsalzt und umgepuffert. Diese Probe wurde über eine mit  $\text{Ni}^{2+}$ -Ionen beladene Affinitätssäule (*HiTrap Chelating*) gegeben und verschiedene Pufferbedingungen, Fließgeschwindigkeiten und Elutionsgradienten getestet. Es fand jedoch keine Bindung des Proteins an das Säulenmaterial statt. Das C-terminale  $(\text{His})_{10}$ -Peptid des Proteins war wahrscheinlich aufgrund einer ungünstigen Faltung oder einer unspezifischen Interaktion mit anderen Proteinen nicht zugänglich.

Als nächstes wurde eine hydrophobe Interaktionschromatographie (*HIC, hydrophobic interaction chromatography*) versucht, bei der eine Bindung von Proteinen an das Säulenmaterial aufgrund einer hohen Ammoniumsulfatkonzentration erreicht wird. Unter diesen Bedingungen erscheinen Proteine nach außen hydrophob, da ihre Ladungen an der Oberfläche „maskiert“ sind. Als Trägermaterial wurde Phenyl-Sepharose (*Hi-Trap Phenyl Sepharose 6 Fast Flow (high sub)*) bzw. Octyl-Sepharose (*Hi-Trap Octyl Sepharose 4 Fast Flow*) eingesetzt. Während an die Phenyl-Sepharose keine effiziente Bindung des exprimierten SFurins stattfand, konnte an der Octyl-Sepharose eine Bindung erreicht, und das Protein wieder eluiert werden. Die erzielte Anreicherung des Enzyms war jedoch gering, so daß auch diese Chromatographiemethode verworfen wurde.

Schließlich wurde eine mehrstufige Reinigungsstrategie versucht. Nach dem Entsalzen und Umpuffern der ammoniumsulfatgefällten Proben wurde eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt. Die erhaltenen Fraktionen wurden erneut entsalzt und anschließend mittels Ausschlußchromatographie getrennt. Nach jedem Reinigungsschritt wurde von den gesammelten Fraktionen die Proteinmenge bestimmt und die SFurin-Aktivität gemessen (3.4.1 und 3.13.1) und daraus die spezifische Aktivität berechnet. Die spezifische Aktivität direkt nach Lösen der gefällten Proteine wurde mit einem Anreicherungsfaktor von 1 gleichgesetzt. Eine Übersicht der einzelnen Reinigungsschritte zeigt Abb. 12.

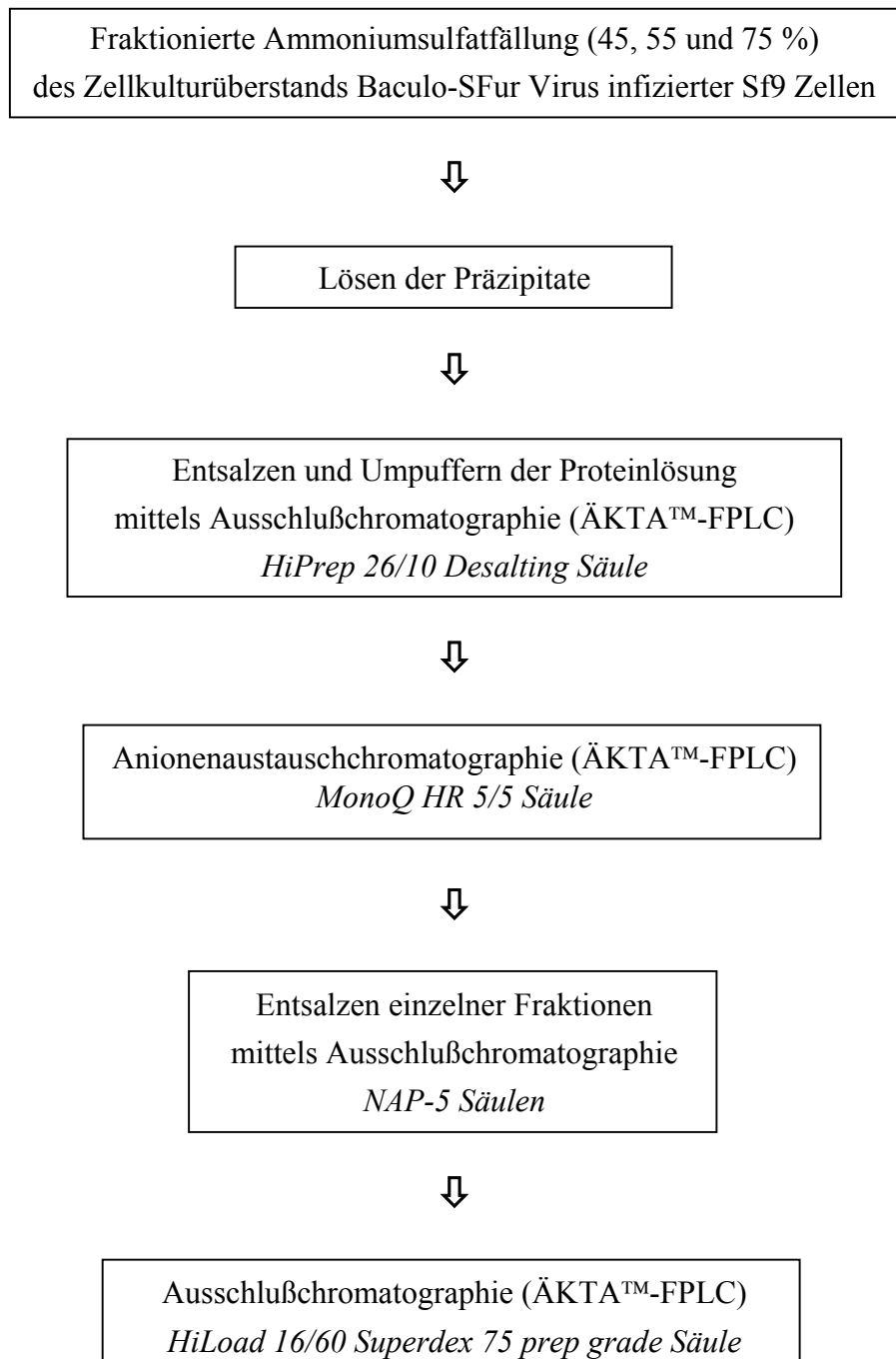


Abb. 12: Fließdiagramm der Reinigung von rekombinanten SFurin.

#### 4.1.4.2 Entsalzen und Umpuffern der Proteinlösungen nach $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung

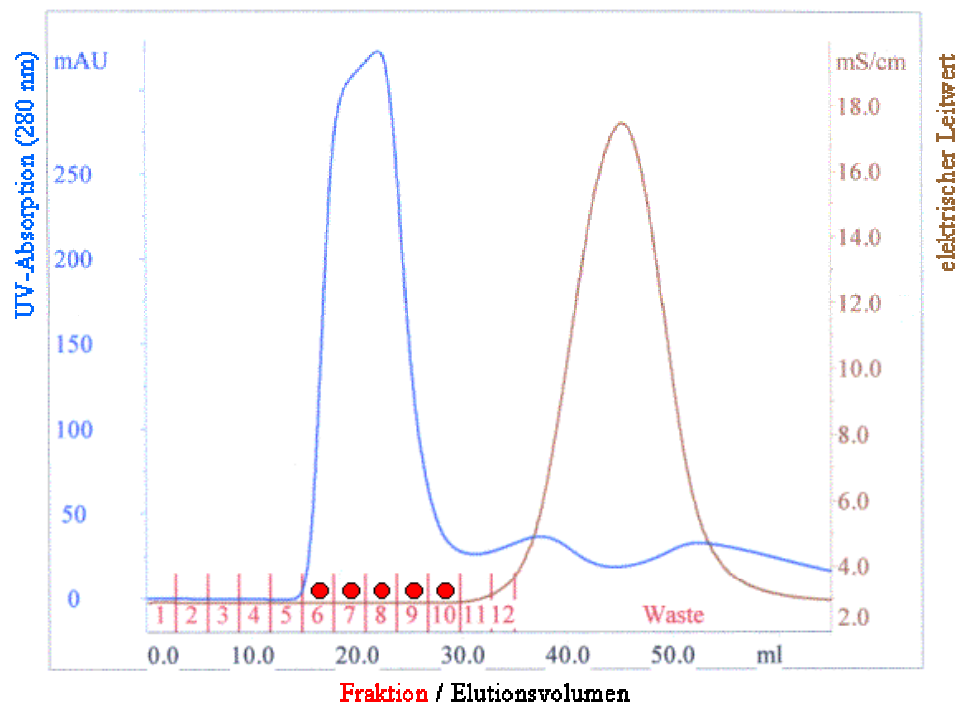
Zur Entfernung des Ammoniumsulfats wurde die Proteinlösung nach dem Prinzip der Ausschlußchromatographie mit Hilfe einer HiPrep 26/10 Desalting Säule entsalzt und umpuffert.

Da das maximale Probenvolumen der Säule 15 ml beträgt, wurden mehrere Trennungen hintereinander durchgeführt. Die Volumina der Ammoniumsulfatfällungen sind unter 4.1.4 aufgeführt. Exemplarisch und repräsentativ ist ein Chromatogramm der Ausschlußchromatographie dargestellt (Abb. 13).

##### A) Chromatographie-Bedingungen

Säule:	HiPrep 26/10 Desalting
Probe:	SFurin, Pellet nach 45 % Ammoniumsulfatfällung resuspendiert
Elution:	isokratisch
Puffer:	100 mM HEPES, 10 mM NaCl, 2 mM $\text{CaCl}_2$ , pH 7,0
Probenvolumen:	15,0 ml
Fraktionsgröße:	3,0 ml
Flußrate:	10,0 ml/min
Temperatur:	RT

##### B) Elutionsprofil



**Abb. 13: Chromatographie-Bedingungen und Elutionsprofil der Entsalzung von SFurin des resuspendierten Pellets nach 45 % Ammoniumsulfatfällung.** Die blaue Kurve zeigt die UV Absorption der Proteine, die braune Kurve den elektrischen Leitwert. Die mit einem roten Punkt markierten Fraktionen wurden vereinigt und weiter aufgereinigt.



Der Verlauf des elektrischen Leitwerts in Abb. 13 zeigt, daß das Salz später von der Säule eluiert und von den Proteinen sauber getrennt ist. Die Proteinlösungen wurden hintereinander mit mehreren chromatographischen Trennungen entsalzt und die proteinhaltigen Fraktionen vereinigt (Tab. 4).

ASU-Fällung	Volumen [ml]	Anzahl der Trennungen	Volumen der vereinigten Fraktionen [ml]
45 %	127	10	200
55 %	30	2	36
75 %	75	5	90

**Tab. 4:** Anzahl der chromatographischen Trennungen zur Entsatzung und Volumina der vereinten Fraktionen.

#### 4.1.4.3 Ionenaustauschchromatographie der entsalzten Proteinlösungen

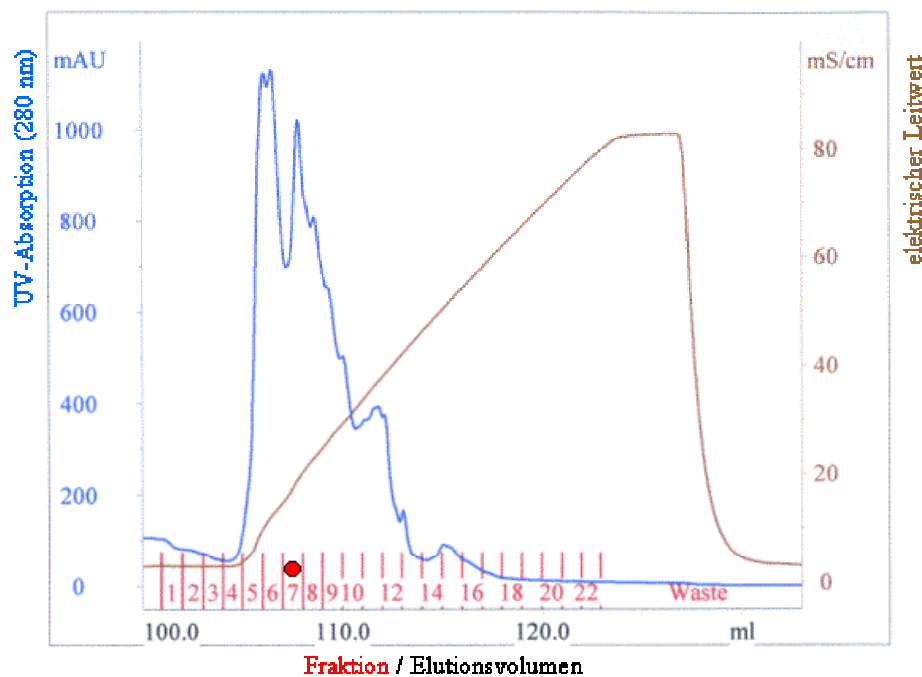
Die erste Stufe der Trennung des Proteinpools wurde auf dem Prinzip der Anionenaustauschchromatographie mit Hilfe einer MonoQ HR 5/5 Säule durchgeführt. Um die Bindungskapazität der Säule nicht zu überschreiten, wurden für die 45 % Ammoniumsulfatfällung zwei Trennungen mit jeweils 100 ml Probenvolumen durchgeführt. Für die 55 % bzw. 75 % Ammoniumsulfatfällung wurde jeweils eine Trennung mit 36 ml bzw. 90 ml Probenvolumen durchgeführt. Exemplarisch und repräsentativ ist ein Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie dargestellt (Abb. 14).

##### A) Chromatographie-Bedingungen

Säule:	MonoQ HR 5/5
Probe:	SFurin, vereinigte Fraktionen nach HiPrep 26/10 Desalting
Elution:	linearer NaCl-Gradient; Länge: 20 ml; NaCl-Konzentration: 10 mM bis 1 M
Puffer A:	100 mM HEPES, 10 mM NaCl, 2 mM CaCl <sub>2</sub> , pH 7,0
Puffer B:	100 mM HEPES, 1 M NaCl, 2 mM CaCl <sub>2</sub> , pH 7,0
Probenvolumen:	100 ml
Fraktionsgröße:	1,0 ml
Flußrate:	1,0 ml/min
Temperatur:	RT

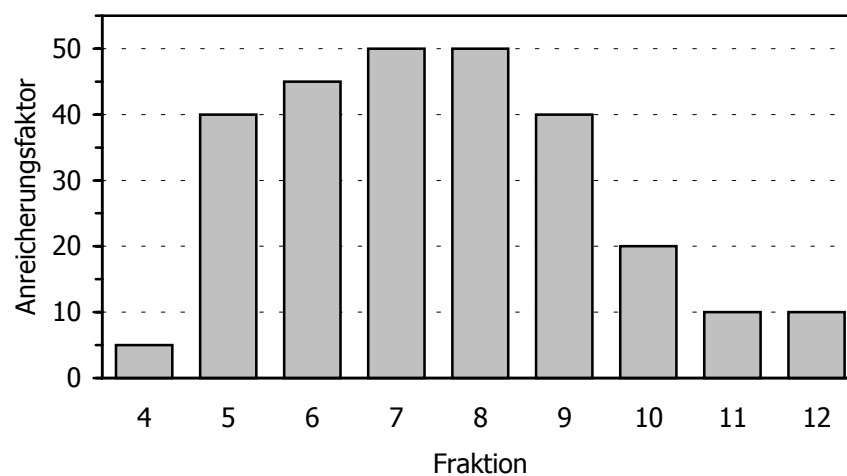
*Siehe Abb. 14 nächste Seite.*

## B) Elutionsprofil



**Abb. 14:** Chromatographie-Bedingungen und Elutionsprofil der Anionenaustauschchromatographie von SFurin der 45 % Ammoniumsulfatfällung nach HiPrep 26/10 Desalting. Die blaue Kurve zeigt die UV Absorption der Proteine, die braune Kurve den elektrischen Leitwert. Die braune Kurve gibt den linearen Anstieg des Salzgradienten wieder. Die mit einem roten Punkt markierte Fraktion 7 wurde weiter aufgereinigt.

Die Fraktionen 4 bis 12 wurden einzeln mittels NAP-5 Säulen entsalzt (3.3). Anschließend wurde die Proteinmenge bestimmt (3.4.1), die Furin-Aktivität gemessen (3.13.1) und der Anreicherungsfaktor bestimmt (ANHANG: Übersicht der Reinigung).



**Abb. 15:** Das Diagramm zeigt die Anreicherungsfaktoren der Fraktionen 4 bis 12 nach Anionenaustauschchromatographie und Entsalzen mittels NAP-5 Säulen.

Abb. 15 zeigte eine breite Verteilung hoher Enzymaktivität mit Anreicherungsfaktoren von 40 bis 50 über die Fraktionen 5 bis 9.

#### **4.1.4.4 Ausschlußchromatographie der entsalzten Proben nach Ionenaustauschchromatographie**

Die zweite Stufe der Trennung wurde auf dem Prinzip der Ausschlußchromatographie mit einer HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade Säule durchgeführt. Es wurde mit Fraktion 7 der Ionenaustauschchromatographie weitergearbeitet, da sich zeigte, daß mit ihr die beste Trennleistung und höchste Anreicherung erzielt werden konnte. Nach dem Entsalzen mit einer NAP-5 Säule hatte die Fraktion ein Volumen von 1,5 ml. Exemplarisch und repräsentativ ist ein Chromatogramm der Ausschlußchromatographie dargestellt (Abb. 16).

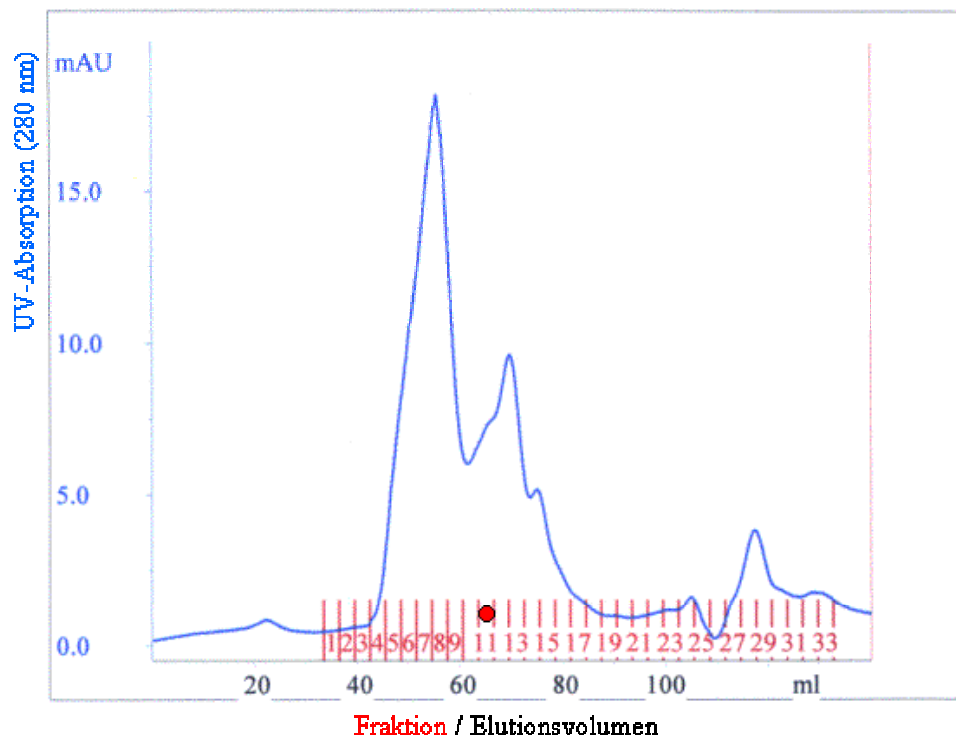
Im ANHANG sind alle Daten der beschriebenen Reinigungsstrategie tabellarisch aufgeführt. Im Einzelnen sind das für jede Fraktion: Volumen, Proteinkonzentration, Proteinmenge, Enzymaktivität, spezifische Aktivität und Anreicherungsfaktor. Auch die Proteingemische nach der 55 % und 75 % Ammoniumsulfatfällung wurden mittels Ionenaustauschchromatographie aufgetrennt. Der maximale Anreicherungsfaktor der 45 % Fällung betrug 50, der der 55 % Fällung 20 und der Faktor der 75 % Fällung 25. Der Anreicherungsfaktor von Fraktion 7 nach Ionenaustauschchromatographie (45 % *Ammoniumsulfatfällung*) von 50 konnte durch den zweiten Reinigungsschritt mittels Molekularsiebchromatographie auf maximale Werte von 480 in Fraktion 10 und 520 in Fraktion 11 gesteigert werden.

##### **A) Chromatographie-Bedingungen**

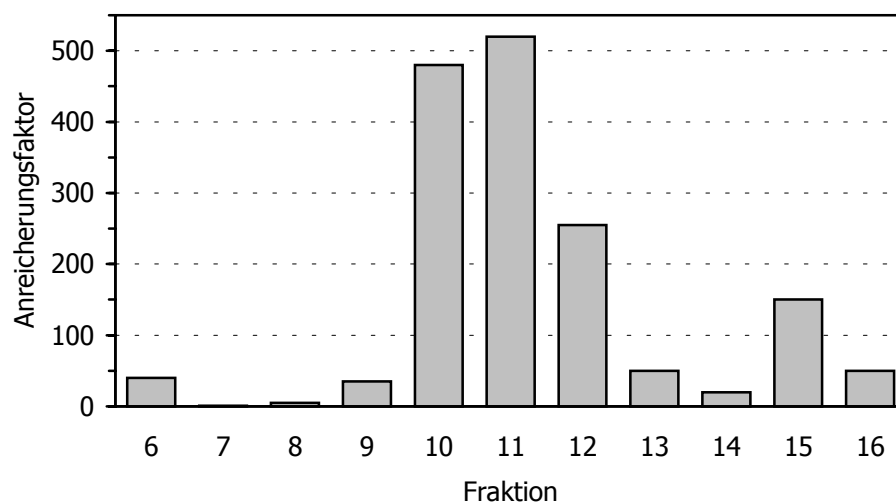
Säule:	HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade
Probe:	SFurin, Fraktion 7 nach MonoQ HR 5/5 ( <i>mit NAP-5 entsalzt</i> )
Elution:	isokratisch
Puffer:	100 mM HEPES, 10 mM NaCl, 2 mM CaCl <sub>2</sub> , pH 7,0
Probenvolumen:	1,5 ml
Fraktionsgröße:	3,0 ml
Flußrate:	0,5 ml/min
Temperatur:	RT

***Siehe Abb. 16 nächste Seite.***

## B) Elutionsprofil



**Abb. 16:** Chromatographie-Bedingungen und Elutionsprofil der Ausschlußchromatographie von SFurin der Fraktion 7 nach Ionenaustauschchromatographie. Die blaue Kurve zeigt die UV Absorption der Proteine. Die mit einem roten Punkt markierte Fraktion 7 wurde zur enzymatischen Charakterisierung im Folgenden eingesetzt.

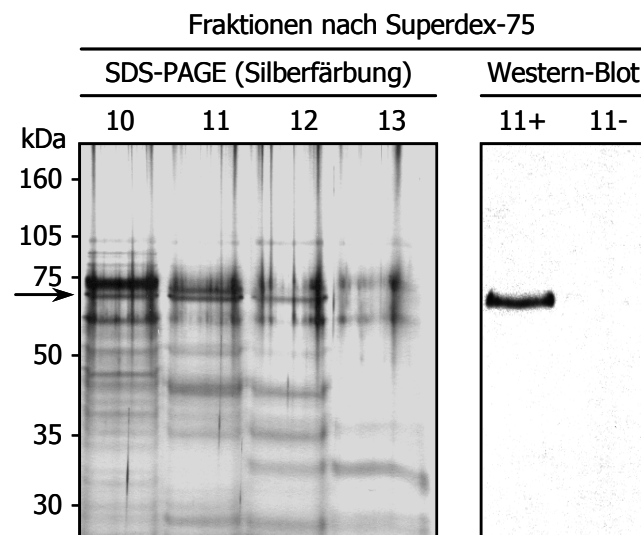


**Abb. 17:** Das Diagramm zeigt die Anreicherungs faktoren der Fraktionen 6 bis 16 nach Ausschlußchromatographie.

#### 4.1.5 Reinheit und Identität des gereinigten, katalytisch aktiven SFurins

Das errechnete Molekulargewicht der exprimierten, katalytisch aktiven SFurin-Domäne beträgt ca. 68 kDa (4.1.3; Abb. 10). Die Proteinlösungen der Fraktionen 10 – 13 des letzten Reinigungsschritts wurden in einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (3.6). Pro Spur wurden 20 µl Proteinlösung (*ca. 250 ng Protein*) aufgetragen. Nach der Trennung wurden die Proteine im Acrylamidgel mit Silber gefärbt (3.6; Abb. 18).

Zum direkten Nachweis des exprimierten, katalytisch aktiven SFurins lag kein spezifischer Antikörper vor. Auch Antikörper gegen das C-terminale (His)<sub>10</sub>-Peptid zeigten keine spezifische Bindung. Der spezifische Nachweis des Proteins wurde wie folgt geführt: 25,0 µl der SFurin-Proteinlösung wurden mit 5,0 µl des kovalent bindenden, biotinylierten Inhibitors C (biotinyl-ε-aminocaproyl-RVKR-cmk; 2.10) 10 min bei 37°C und anschließend 30 min auf Eis inkubiert. Nach Bindung des Inhibitors an das katalytische Zentrum von SFurin wurde die Probe in einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (3.6). Anschließend wurde ein Western-Blot durchgeführt (3.7). Zum Nachweis Biotin-markierter Proteine wurde die Nitrocellulose-Membran mit Streptavidin-Peroxidase inkubiert und die biotinylierte Proteinbande mittels Chemolumineszenz sichtbar gemacht (3.8; Abb. 18).



**Abb. 18: SDS-PAGE der Fraktionen 10 – 13 und Western Blot von Fraktion 11 nach Superdex-75.** Der Pfeil in Höhe von 70 kDa markiert das überexprimierte und gereinigte SFurin. Der Western-Blot zeigt in Spur (11+) die Fraktion 11 mit, in Spur (11-) ohne biotinylierten Inhibitor.

Abb. 18 zeigt, daß das exprimierte, katalytisch aktive SFurin mit einem Molekulargewicht von 70 kDa identifiziert werden konnte. Die Spezifität der kovalenten Bindung des

biotinylierten Inhibitors an SFurin verdeutlicht der Western-Blot. In der Kontrollspur (11-) ohne Inhibitor konnte kein biotinmarkiertes Protein gezeigt werden, während in der Spur (11+) der biotinylierte Enzym-Inhibitor-Komplex als solitäre Proteinbande sichtbar wird. Der Vergleich mit Abb. 17 zeigt, daß die Intensität der mit dem Pfeil markierten Banden der Silberfärbung von Fraktion 10 bis 13 in Höhe von ca. 70 kDa mit deren Anreicherungsfaktoren korreliert, die für Fraktion 10 mit 480 und Fraktion 11 mit 520 am höchsten sind. Der Vergleich aller Proteinbanden im silbergefärbten SDS-Polyacrylamidgel zeigt für Fraktion 11 deutlich weniger Fremdproteine, so daß mit dieser Fraktion mit einem Volumen von 3,0 ml die folgenden Kinetikuntersuchungen durchgeführt wurden.

## **4.2 Enzymatische Charakterisierung des katalytisch aktiven SFurins**

Die bisherigen Ergebnisse (4.1.3 – 4.1.5) zeigen, daß die Expression der ersten 700 Aminosäuren von SFurin mit Hilfe rekombinanter Baculoviren zu einem katalytisch aktiven, ca. 70 kDa großen, in das Zellkulturmedium infizierter Sf9-Zellen sezernierten Protein führt. Nach Anreicherung des Proteins mittels verschiedener chromatographischer Reinigungsverfahren steht eine gereinigte, hoch aktive SFurin-Proteinlösung zur Verfügung. Ziel der enzymatischen Charakterisierung war zum einen die Kinetik des gereinigten Enzyms zu untersuchen und zum anderen zu testen, ob das Enzym seine Thermostabilität behalten hat (Cieplik et al., 1998).

### **4.2.1 Michaelis-Menten Enzymkinetik**

Die Enzymkinetik wurde *in vitro* mit dem bereits beschriebenen Enzymaktivitäts-Test ermittelt (3.13). Dieser Test basiert auf der Spaltung des Furin-Substrats Abz-RVKRGLAY(NO<sub>2</sub>)D-OH (Angliker et al., 1995) und der daraus resultierenden Aufhebung der intramolekularen Fluoreszenz-Unterdrückung. Die gemessene Fluoreszenz ist direkt proportional zur Enzymaktivität (3.13).

Zur Bestimmung der Michaelis-Konstante  $k_M$  wurde zuerst die Anfangsgeschwindigkeit der mittels SFurin katalysierten Spaltung gemessen (Abb. 19). Dazu wurden die Ansätze bei 37°C für Zeitspannen von einer bis 30 Minuten inkubiert und die Enzymaktivität gemessen (3.13.1). Abb. 19 zeigt, daß nach ca. 22 min das Substrat vollständig gespalten ist. Es kommt zu keinem weiteren Anstieg der Fluoreszenz.

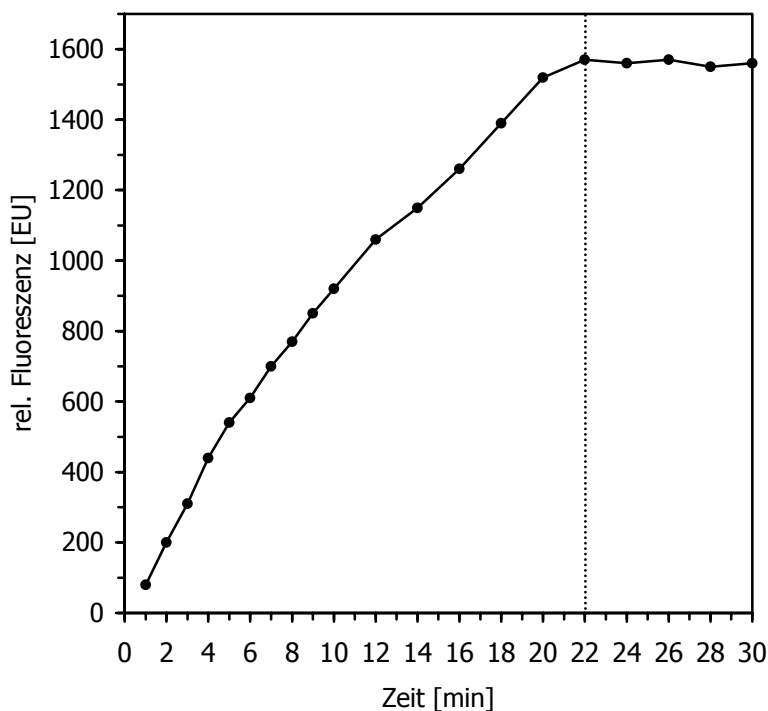
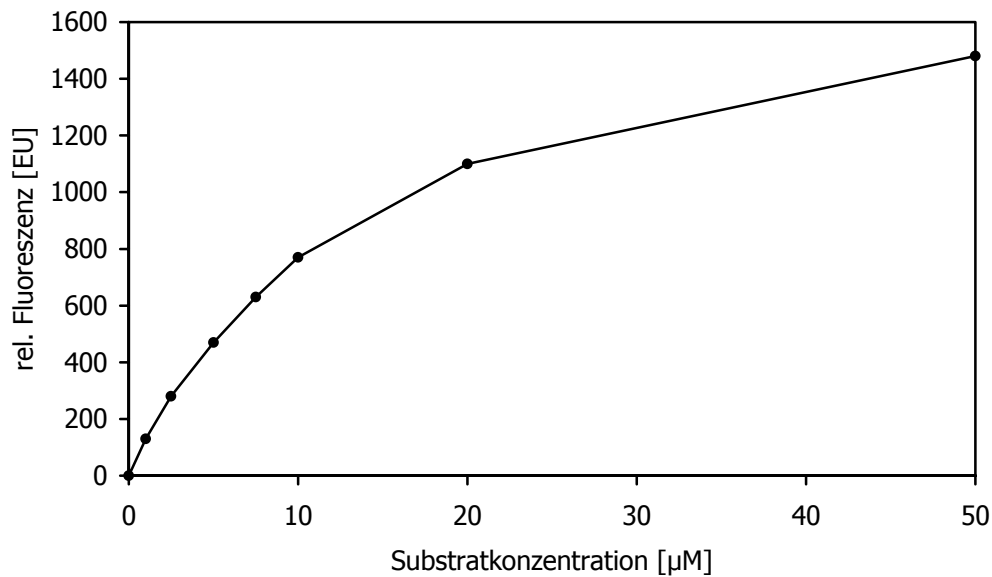


Abb. 19: Enzymkinetik der Spaltung von Abz-RVKRGLAY(NO<sub>2</sub>)D-OH mittels SFurin.

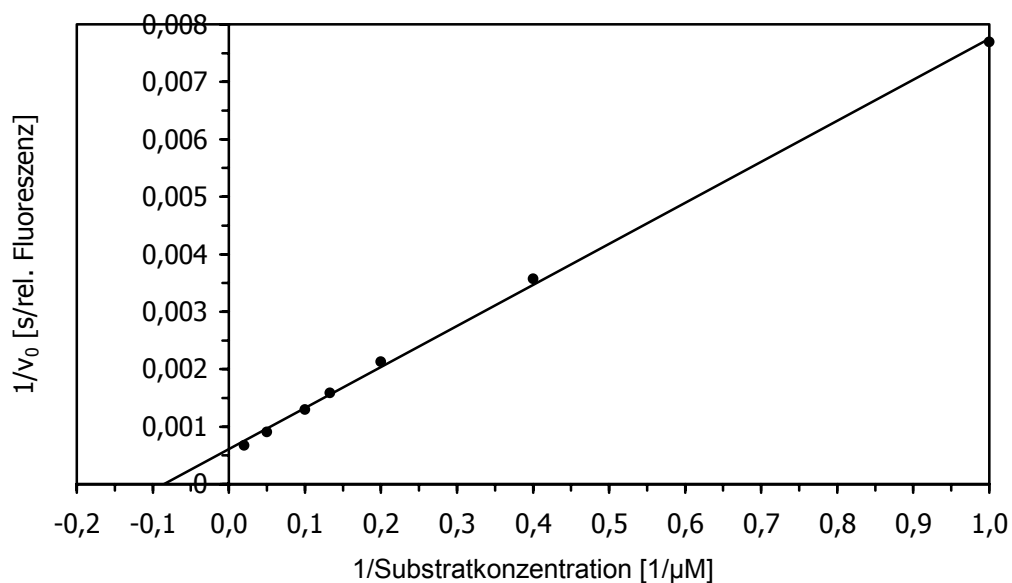
Die Michaelis-Konstante  $k_M$  entspricht derjenigen Substratkonzentration, bei der die Geschwindigkeit die Hälfte des Maximalwerts ( $v_{\max}/2$ ) erreicht. Eine hohe Affinität des Enzyms zum Substrat führt somit zu einem niedrigen  $k_M$ -Wert und umgekehrt. Zur Bestimmung der Michaelis-Konstante  $k_M$  wurde bei verschiedenen Substratkonzentrationen die Enzymaktivität gemessen (3.13.1; Abb. 20). Das Michaelis-Menten Modell geht davon aus, daß die enzymatische Rückreaktion vernachlässigt werden kann. Es muß also die Anfangsgeschwindigkeit  $v_0$  gemessen werden. Dafür wurde die Reaktionszeit bei 37°C auf 5 min verkürzt. In diesem Bereich steigt die Reaktionsgeschwindigkeit steil an (Abb. 19) und das chemische Gleichgewicht der Reaktion liegt vollständig auf der Seite der Reaktionsprodukte.

Zur Auswertung wurden die in Abb. 20 aufgetragenen Meßwerte doppelt reziprok, als Lineweaver-Burk-Plot, aufgetragen (Voet, 1992). Es resultiert eine Gerade, aus deren Geradengleichung die Michaelis-Konstante  $k_M$  berechnet werden kann (Abb. 21). Für die Reaktion des rekombinanten, gereinigten SFurins mit dem Substrat Abz-RVKRGLAY(NO<sub>2</sub>)D-OH wurde folgende Michaelis-Konstante bestimmt:

$k_M = 12 \mu\text{M}.$



**Abb. 20: Michaelis-Menten-Kinetik.** Der Kurvenverlauf zeigt die Enzymaktivität von SFurin bezüglich der Spaltung des Substrats Abz-RVKRGLAY(NO<sub>2</sub>)D-OH im frühen Stadium der Reaktion ( $t = 5 \text{ min}$ ). Es wurden 8 verschiedene Substratkonzentrationen ( $1,0 \text{ μM}$ ;  $2,5 \text{ μM}$ ;  $5,0 \text{ μM}$ ;  $7,5 \text{ μM}$ ;  $10,0 \text{ μM}$ ;  $20,0 \text{ μM}$  und  $50,0 \text{ μM}$ ) eingesetzt.

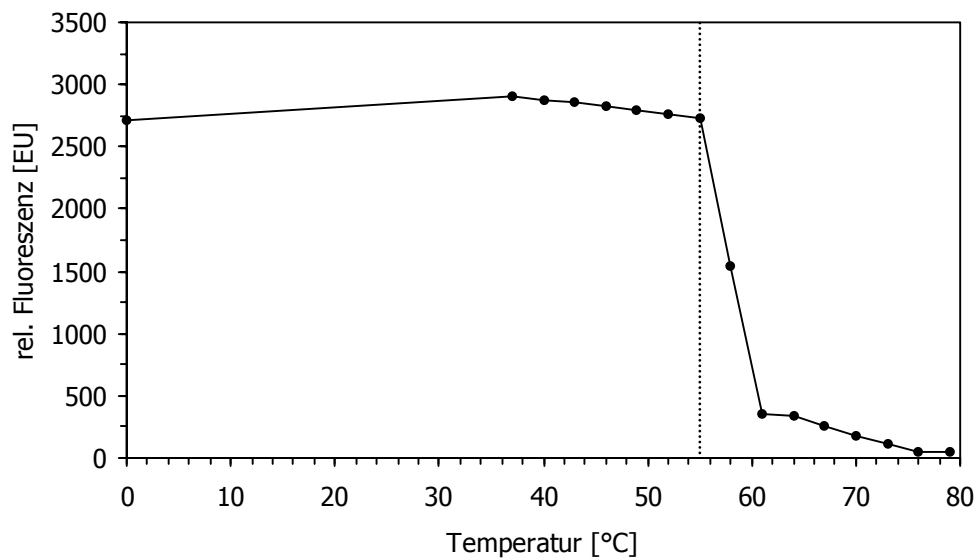


**Abb. 21: Lineweaver-Burk-Plot:** Aus der doppelt reziproken Darstellung der Werte der Michaelis-Menten-Kinetik resultiert eine Gerade mit der Geradengleichung:  $(1/v_0) = 7,1 \cdot 10^{-3} (1/[S]) + 6,0 \cdot 10^{-4}$ . Der Schnittpunkt mit der Abszisse hat den Wert  $-(1/k_M)$ , der Schnittpunkt mit der Ordinate entspricht  $(1/v_{\max})$  und die Steigung der Geraden beträgt  $(k_M/v_{\max})$ .  $k_M$  ist die Michaelis-Konstante,  $v_0$  die Anfangsgeschwindigkeit,  $v_{\max}$  die Maximalgeschwindigkeit und  $[S]$  die Substratkonzentration.



#### 4.2.2 Untersuchung der Thermostabilität

Die Thermostabilität wurde mit dem in 3.13.1 beschriebenen *in vitro* Enzymaktivitätstest ermittelt. Dazu wurden mehrere Parallelansätze ohne Substrat 10 min bei verschiedenen Temperaturen ( $0^{\circ}\text{C}$  und  $37^{\circ}\text{C}$  bis  $79^{\circ}\text{C}$  in  $3^{\circ}\text{C}$ -Intervallen) vorinkubiert, für 1 min auf Eis gekühlt und erst dann mit dem Substrat versetzt. Nach weiterer 30 minütiger Inkubation bei  $37^{\circ}\text{C}$  wurden die Ansätze vermessen (Abb. 22).



**Abb. 22: Thermostabilitäts-Profil von SFurin.**

Das Diagramm zeigt, daß SFurin bis  $55^{\circ}\text{C}$  nahezu unverändert aktiv ist. Bei einer Temperatur von  $58^{\circ}\text{C}$  ist die Aktivität auf 50 % gesunken und ab  $61^{\circ}\text{C}$  fällt die Aktivität unter 20 % ab. Ab  $76^{\circ}\text{C}$  ist SFurin vollständig inaktiviert.

### 4.3 Klonierung, Expression, Reinigung und Kristallisation der Prodomäne von *Spodoptera frugiperda* Furin

Die Aminosäuresequenz der bakteriell exprimierten SFurin Prodomäne ist in Abb. 23 dargestellt. Sie ist aufgrund der im Folgenden beschriebenen Klonierung und Expression von 85 auf 89 Aminosäuren N-terminal verlängert. Das berechnete Molekulargewicht beträgt 10,7 kDa und sie besitzt einen basischen isoelektrischen Punkt von 9,9. Aufgrund des basischen Charakters konnte die Domäne zur Reinigung in einem Puffer von pH 7,6 an die negativ geladenen Methylsulfonat-Gruppen einer MonoS Ionenaustausch-Säule gebunden werden (4.3.3).

```

1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70
|         |         |         |         |         |         |
ISEFLPEPVYHDQFAVHVPAGPHHVDDIARRHGFVNHGQIGSLKNYYLLSHHEVRKRSTEPSHEHHKLN

71.....80.....
|         |
DEPQVRWFEQQREKRRIKR

```

**Abb. 23:** Aminosäuresequenz der bakteriell exprimierten Prodomäne von SFurin. Punktiert unterstrichen sind die 4 artifiziellen Aminosäuren aus dem Vektor pMAL-c2 nach Faktor Xa Spaltung (4.3.2). Einfach unterstrichen sind die beiden dibasischen Motive und doppelt unterstrichen die beiden aufeinanderfolgenden multibasischen Furin-Spaltmotive der SFurin Prodomäne.

#### 4.3.1 Klonierung der Prodomäne von SFurin in den Vektor pMAL-c2

Das für die Prodomäne kodierende Gen von *Spodoptera frugiperda* Furin umfaßt 255 Nukleotide, von Position 505 bis 759 des Vektors pBluescript SK/sfur 93-6385 (*Klon 5*), der als Matrize der Klonierung galt (ANHANG). Ziel der Klonierung war der bakterielle Expressionsvektor pMAL-c2.

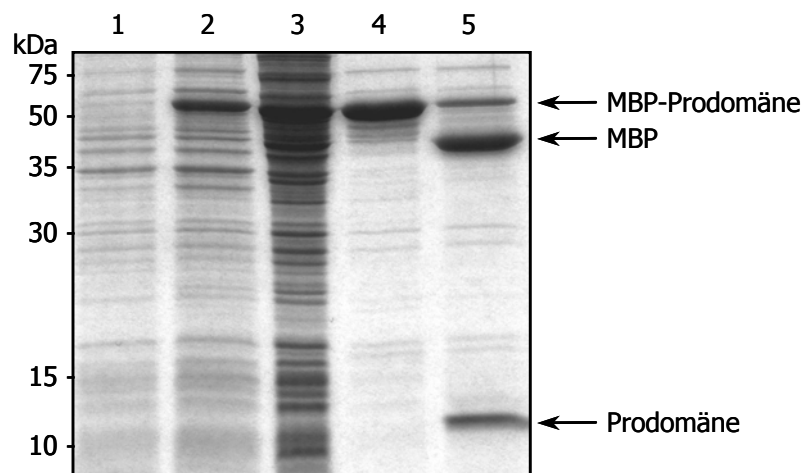
Das Gen der Prodomäne wurde unter Verwendung der Primer fSFur 505 *EcoRI* und rSFur 759 *Sall* (STOP) mittels PCR amplifiziert (3.1.3). Das erzeugte PCR-Produkt wurde in den Vektor pCR 2.1 subkloniert (3.1.14). Mit Hilfe der eingesetzten, überhängenden Primer wurde an das 255 bp lange Gen 5' eine *EcoRI*- und 3' ein Stopp-Codon sowie eine *Sall*-Restriktionsschnittstelle angefügt. Die Subklonierung in den Vektor pCR 2.1 war notwendig, da die direkte Insertion des PCR-Produkts in den Vektor pMAL-c2 nicht gelang.

Mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *Sall* wurde zum einen das Gen der

Prodomäne aus dem Vektor pCR 2.1 herausgeschnitten, im Agarosegel aufgetrennt und aus dem Gel extrahiert (3.1.5; 3.1.7; 3.1.8), zum anderen wurde der Vektor pMAL-c2 mit denselben Enzymen verdaut, mit Phosphatase behandelt und mit dem *QIAquick PCR Reinigungskit* gereinigt (3.1.4 – 3.1.6). Schließlich wurden beide linearisierten DNA-Fragmente ligiert, in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert, selektioniert und die Plasmid-DNA präpariert (3.1.9 – 3.1.12). Mit Hilfe der Oligonukleotide pMAL-c2 forward und pMAL-c2 reverse wurden mehrere Klone sequenziert (3.1.13). Die DNA eines mutationsfreien Klons wurde zur Proteinexpression in *E. coli* BL-21 transformiert (3.1.11).

#### 4.3.2 Expression der Prodomäne von SFurin

Die SFurin Prodomäne wurde bakteriell als Maltosebindungsprotein (MBP)-Fusionsprotein exprimiert (3.1.2). Pro Präparation wurden 4 l Bakteriensuspension kultiviert. Zur Überprüfung der Expression (3.2.1), der Affinitätsreinigung mit Amylose-Harz (3.2.2) und der proteolytischen Spaltung des Fusionsproteins mittels Faktor Xa (3.2.3) wurden zu bestimmten Zeitpunkten Proben entnommen. Jeweils 15  $\mu$ l wurden auf ein 15 %iges SDS-Polyacrylamid-gel aufgetragen und mit Coomassie gefärbt (3.6; Abb. 24).



**Abb. 24: SDS-PAGE verschiedener Stufen der bakteriellen Expression der SFurin Prodomäne.** In **Spur 1** ist Bakteriensuspension vor Induktion, in **Spur 2** nach Induktion mit IPTG aufgetragen. **Spur 3** zeigt das Klarlysate, **Spur 4** das Eluat nach Affinitätsreinigung mittels Amylose-Harz und **Spur 5** zeigt das Eluat nach Spaltung mit Faktor Xa.

Der Vergleich von Spur 1 vor Induktion mit Spur 2 nach Induktion in Abb. 24 zeigt eine prominente Bande in Höhe von 53 kDa. Hierbei handelt es sich um das stark überexprimierte

MBP-Prodomäne-Fusionsprotein. Im Klarlysat in Spur 3 ist neben dem Fusionsprotein die Vielzahl der löslichen, bakteriellen Proteine zu erkennen. Spur 4 zeigt nach Affinitätsreinigung des Fusionsproteins eine deutliche Anreicherung des Proteins von über 90 %. Nach Spaltung des Fusionsproteins sind in Spur 5 zwei neue Proteinbanden zu erkennen, das MBP in Höhe von 43 kDa und die SFurin Prodomäne in Höhe von 11 kDa.

#### 4.3.3 Reinigung der SFurin Prodomäne mittels Ionenaustauschchromatographie

Die Isolierung der Prodomäne wurde auf dem Prinzip der Ionenaustauschchromatographie mit Hilfe einer MonoS HR 5/5 Kationenaustausch-Säule durchgeführt. Das Chromatogramm zeigt Abb. 25.

##### A) Chromatographie-Bedingungen

Säule:	MonoS HR 5/5
Probe:	SFurin Prodomäne nach Spaltung mit Faktor Xa
Elution:	NaCl-Stufengradient
Puffer A:	50 mM HEPES, 25 mM NaCl, pH 7,6
Puffer B:	50 mM HEPES, 1 M NaCl, pH 7,6
Fraktionsgröße:	1,0 ml
Flußrate:	1,0 ml/min
Temperatur:	RT

##### B) Elutionsprofil

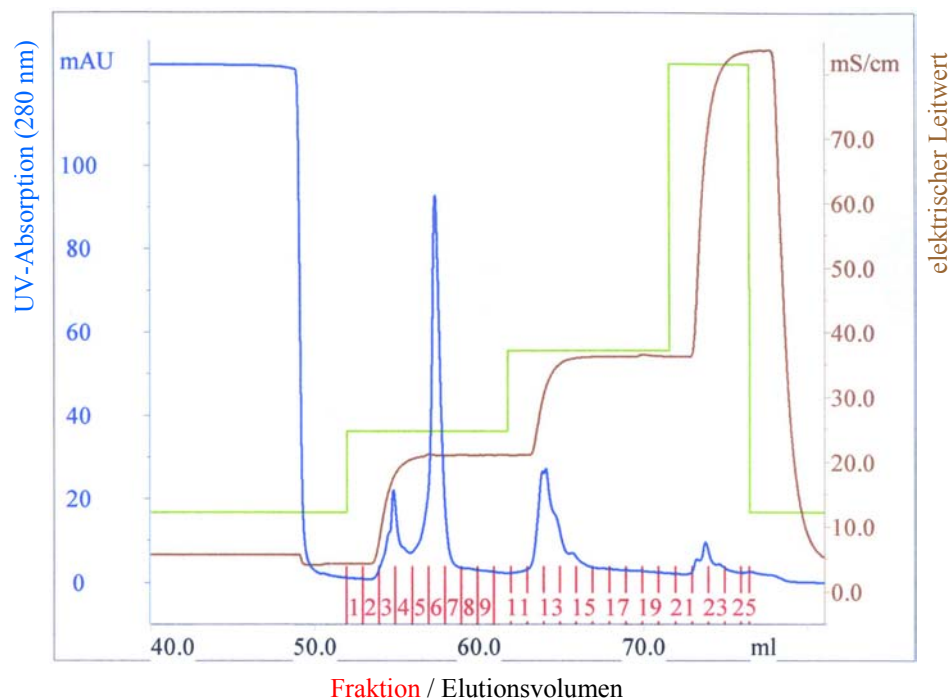
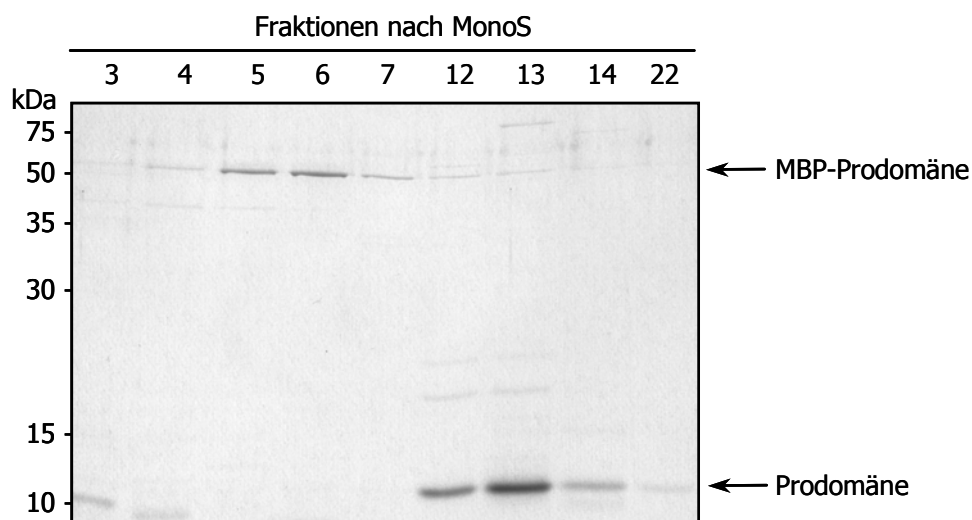


Abb. 25: Text siehe nächste Seite.

**Abb. 25: Elutionsprofil der Kationenaustauschchromatographie der SFurin Prodomäne nach Faktor Xa Spaltung.** Die blaue Kurve zeigt die UV Absorption der Proteine, die braune Kurve den elektrischen Leitwert und die grüne Kurve den Soll-Wert des gewünschten Stufengradienten. Die braune Kurve gibt den Ist-Wert des Salzgradienten wieder.

Die Proteinlösungen der Fraktionen 3 bis 7, 12 bis 14 und 22 des letzten Reinigungsschritts wurden in einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (3.6). Pro Spur wurden 10 µl Proteinlösung aufgetragen und mit Coomassie gefärbt (3.6; Abb. 26).



**Abb. 26: SDS-PAGE der Fraktionen 3-7, 12-14 und 22 nach Mono S HR 5/5.**

Das Gel zeigt eine deutliche Trennung von ungespaltener MBP-Prodomäne (3-7) und abgespaltener Prodomäne (12-14). Das MBP allein bindet nicht an die MonoS und befindet sich im Durchfluß (*nicht im Gel gezeigt*). Der Puffer zur Spaltung des Fusionsproteins mußte 0,5 % Octylglucosid enthalten. Dies war erforderlich, um eine Präzipitation der Prodomäne zu vermeiden. Die SFurin Prodomäne konnte mit einer Reinheit von über 95 % und einer Ausbeute nach chromatographischer Reinigung von ca. 300 µg pro Liter Bakterienkultur isoliert werden.

#### 4.3.4 Kristallisation der Prodomäne von *Spodoptera frugiperda* Furin

Die bakteriell exprimierte und gereinigte SFurin-Prodomäne wurde auf eine Konzentration von 3 mg/ml ankonzentriert (3.3). Die Proteinlösung wurde zu Kristallisationsversuchen unter Anwendung der „hanging drop“ Methode eingesetzt (3.14). Es wurden insgesamt 196 Kristallisationsansätze mit den Puffern des *Crystal Screen I und II (Macromolecular Crystallization Reagent Kit*, 2.6) pipettiert. Die Zusammensetzung dieser Puffer basiert auf empirisch ermittelten Daten.

Zwei verschiedene, reproduzierbare Kristallformen wurden nach einer Woche bei Raumtemperatur erhalten (*Kristallisation bei Dr. Ralf Ficner, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen*). Zum einen bildeten sich Nadeln, zum anderen kompakte Einkristalle. Die Nadeln kristallisierten in einem Puffer der Zusammensetzung 0,1 M Tris/HCl, pH 8,5 mit 2,0 M Ammoniumsulfat, die Einkristalle in einem Puffer mit 0,1 M HEPES, pH 7,5 mit 1,4 M Natriumcitrat. Die Kristalle hatten eine Größe von 20 µm in ihrer längsten Dimension (Abb. 27).



A)



B)

**Abb. 27:** Zwei verschiedene Kristallformen der Prodomäne von SFurin: A) Nadeln und B) kompakte Einkristalle.



Die reversibel bindenden Inhibitoren gehören zu den kompetitiven Hemmstoffen. Hingegen zählen die kovalent bindenden Inhibitoren („*Selbstmord-Substrate*“) zu den nicht kompetitiven Hemmstoffen. Dieser Unterschied wird in der Kinetik der gehemmten Reaktion sichtbar.

#### 4.4.2 Übersicht der eingesetzten Peptid-Inhibitoren

Kurz-bezeichnung	Peptidaufbau	Art der Hemmung
<b>A</b>	dec-RVKR-cmk	nicht kompetitiv
<b>B</b>	dec-RVR <u>K</u> -cmk	
<b>C</b>	biotinyl-ε-aminocaproyl-RVKR-cmk	
<b>D</b>	H <sub>2</sub> N-HRYRVCRC-CONH <sub>2</sub>	kompetitiv
<b>E</b>	H <sub>2</sub> N-LLRVKR-CONH <sub>2</sub>	
<b>F</b>	H <sub>2</sub> N-RRRRRRRRR-CONH <sub>2</sub>	
<b>G</b>	myristyl-RRRRRRRRR-CONH <sub>2</sub>	
<b>H</b>	H <sub>2</sub> N-PRHSRLQREPQVQWLEQQVAKRRTKR-CONH <sub>2</sub>	
<b>I</b>	myristyl-PRHSRLQREPQVQWLEQQVAKRRTKR-CONH <sub>2</sub>	
<b>J</b>	H <sub>2</sub> N-QQVAKRRTKR-CONH <sub>2</sub>	
<b>K</b>	myristyl-QQVAKRRTKR-CONH <sub>2</sub>	

**Tab. 5: Übersicht der getesteten Peptid-Inhibitoren.** Jeder Inhibitor wurde mit einem Buchstaben (A-K) bezeichnet (*Spalte 1*). In Spalte 2 ist die Aminosäure-Sequenz gezeigt; die Peptide tragen neben NH<sub>2</sub>-Gruppen auch andere Enden (*cmk*: Chloromethylketon, *dec*: Decanoyl). Spalte 3 gibt die Art der Hemmung wieder.

Die hydrophoben, N-terminalen Myristyl- oder Decanoyl-Gruppen dienen *in vivo* dazu, in zelluläre Membranen zu inserieren und das im *trans*-Golgi-Netzwerk lokalisierte native Furin effizient zu hemmen. Der „biotinyl-ε-aminocaproyl“-Rest dient der Identifikation durch Streptavidin gekoppelte Antikörper und kann zur Affinitätsreinigung des Enzym-Inhibitor Komplexes mittels Streptavidin-Sepharose eingesetzt werden.



#### 4.4.3 Ziel der Inhibitionsstudien und Versuchsbedingungen

Ziel der Inhibitionsstudien war, die Hemmkonstante  $k_i$  der in Tabelle 2 aufgeführten Inhibitoren zu bestimmen. Die Hemmkonstante  $k_i$  ist ein Maß für die Stärke einer Hemmung; je fester der Inhibitor an das Enzym bindet, desto niedriger ist der Wert von  $k_i$  (Voet, 1992). Die Untersuchung der Inhibitionskinetik wurde mit dem bereits beschriebenen *in vitro* Enzymaktivitäts-Test durchgeführt (3.13).

Zur Bestimmung der Hemmkonstante  $k_i$  wurden für jeden Inhibitor mehrere Meßreihen aufgemommen. Bei 4 verschiedenen Substratkonzentrationen von 2,5  $\mu\text{M}$ , 5,0  $\mu\text{M}$ , 25,0  $\mu\text{M}$  und 50,0  $\mu\text{M}$  wurden bis zu 11 unterschiedliche Inhibitorkonzentrationen zwischen 100  $\mu\text{M}$  und 10 pM eingesetzt. Auf dieser Basis wurde der Bereich der Inhibitorkonzentration ermittelt, der zur graphischen Darstellung und Auswertung herangezogen werden konnte. Zu hohe Inhibitorkonzentrationen mit vollständiger Hemmung oder zu niedrige Inhibitorkonzentrationen ohne Hemmung der Enzymaktivität wurden nicht zur Bestimmung von  $k_i$  verwendet.

Die Hemmkonstante  $k_i$  wurde durch graphische Darstellung der gemessenen Inhibitionsdaten in Dixon-Plots bestimmt. Dazu wurde in Abhängigkeit von der Substratkonzentration der reziproke Wert der gemessenen Fluoreszenz graphisch aufgetragen. Für jede Inhibitorkonzentration entsteht eine Gerade. Mehrere dieser Geraden schneiden sich in einem Punkt. Die Substratkonzentration des Schnittpunkts der Geraden gibt die Hemmkonstante  $k_i$  des verwendeten Inhibitors wieder. Liegt der Schnittpunkt der Geraden des Dixon-Plots auf der Abszisse, so handelt es sich um einen nicht kompetitiven Inhibitor. Im Fall eines kompetitiven Inhibitors liegt der Schnittpunkt der Geraden deutlich oberhalb der Abszisse (Dixon, Webb, 1967).

#### 4.4.4 Dixon-Plots der potentiellen Furin-Peptidinhibitoren

Nachfolgend dargestellt sind die Dixon-Plots der in Tab. 5 aufgelisteten Peptidinhibitoren. Die Inhibitoren A, B und C enthalten C-terminal ein Chloromethylketon (*cmk*) und binden kovalent an das katalytische Zentrum von SFurin. Ihre Hemmung ist nicht kompetitiv. Hingegen wirken die Inhibitoren D bis K kompetitiv. Die Paare F/G, H/I und J/K unterscheiden sich lediglich durch einen N-terminalen Myristyl-Rest. Die unterstrichenen Aminosäuren geben jeweils die multibasische Furin Konsensus-Spaltsequenz der Form RXKR wieder.

Die in den Dixon-Plots dargestellten Meßwerte sind die Mittelwerte mehrerer, unabhängig voneinander aufgenommener Meßreihen. Die eingezeichneten Ausgleichsgeraden wurden anhand der Meßwerte mittels linearer Regression berechnet (*MS Excel 2000*).

• **Inhibitor A:**      dec-RVKR-cmk

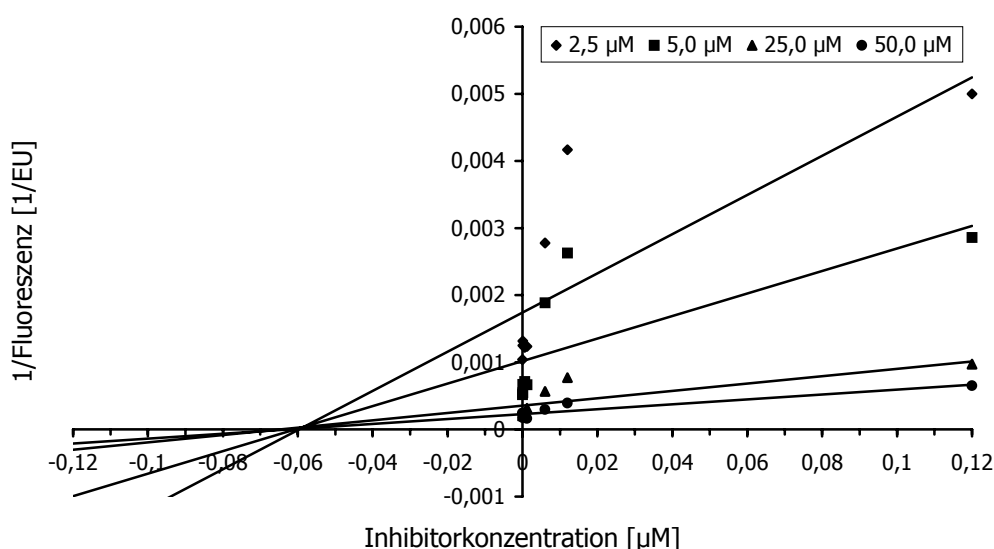


Abb. 29: Dixon-Plot von Inhibitor A. Die bestimmte Hemmkonstante  $k_i$  beträgt 60 nM.

• Inhibitor B: dec-RVRK-cmk

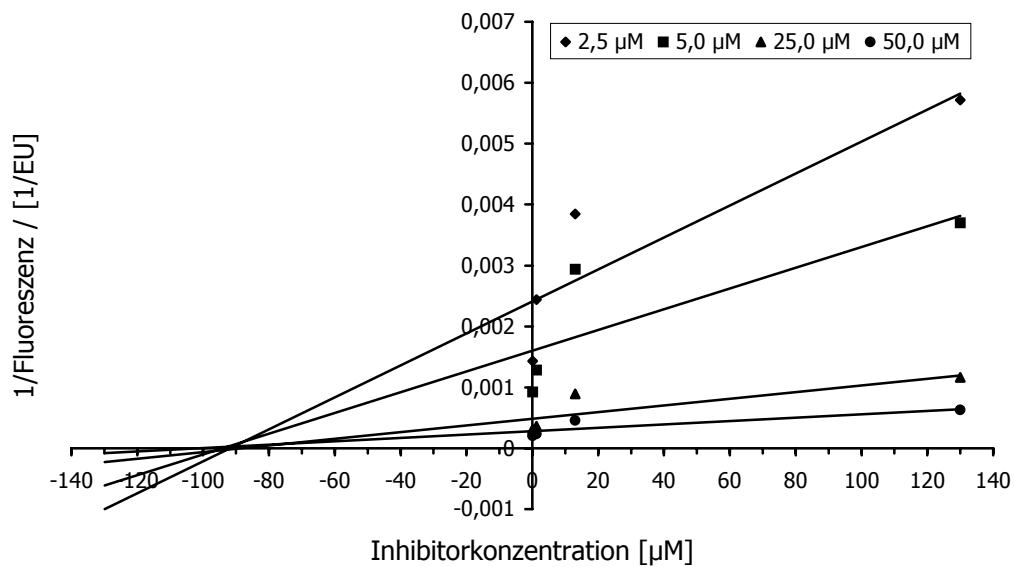


Abb. 30: Dixon-Plot von Inhibitor B. Die bestimmte Hemmkonstante  $k_i$  beträgt 90  $\mu\text{M}$ .

• Inhibitor C: biotinyl- $\epsilon$ -aminocaproyl-RVKR-cmk

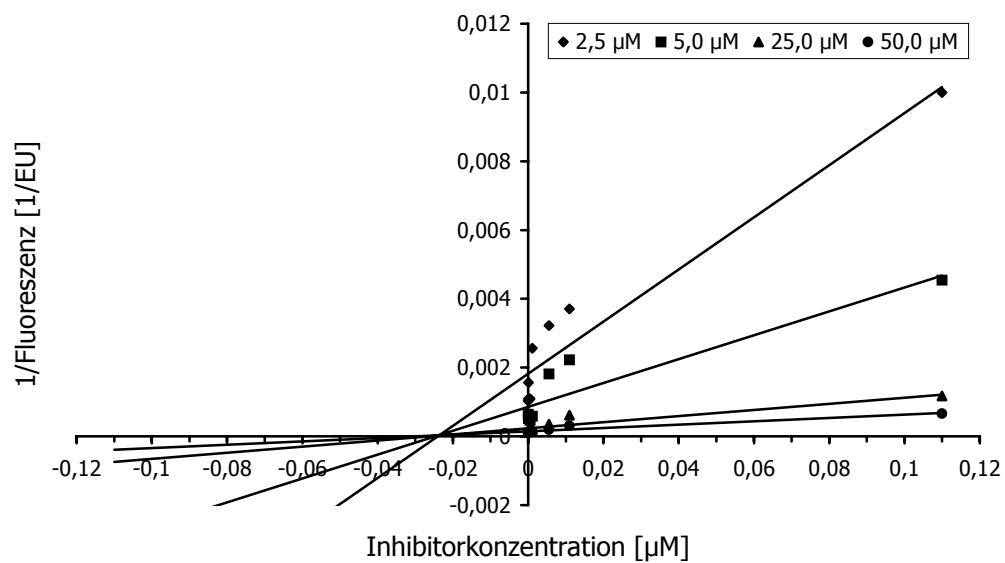


Abb. 31: Dixon-Plot von Inhibitor C. Die bestimmte Hemmkonstante  $k_i$  beträgt 30 nM.

• Inhibitor D:  $\text{H}_2\text{N-HRYRVCRC-CONH}_2$

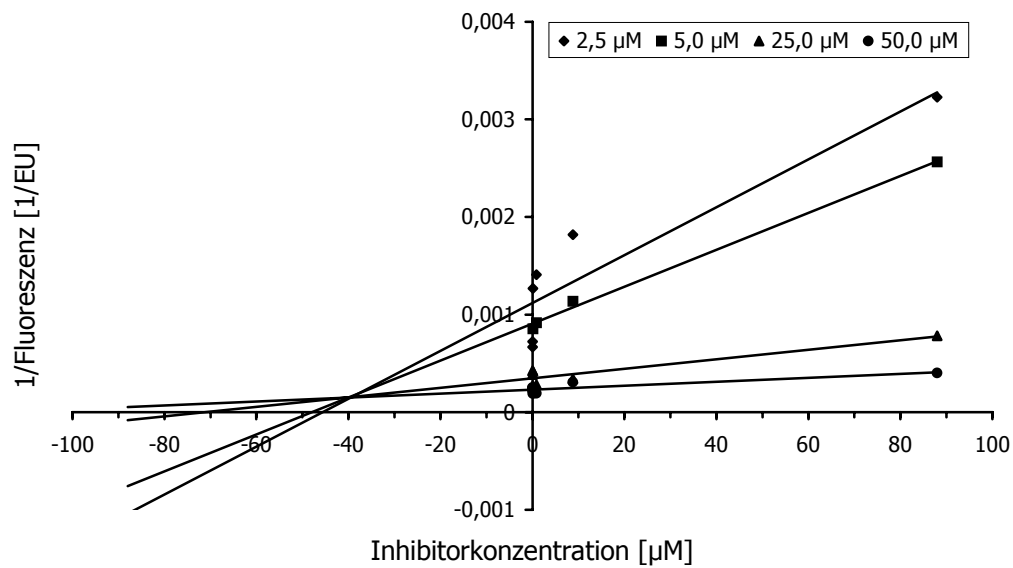


Abb. 32: Dixon-Plot von Inhibitor D. Die bestimmte Hemmkonstante  $K_i$  beträgt 40  $\mu\text{M}$ .

• Inhibitor E:  $\text{H}_2\text{N-LLRVKR-CONH}_2$

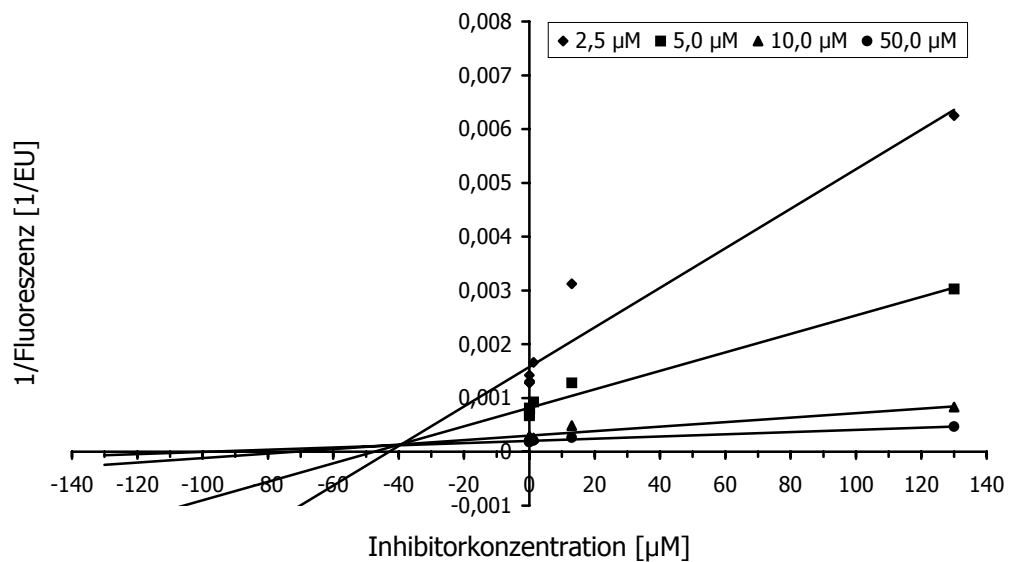


Abb. 33: Dixon-Plot von Inhibitor E. Die bestimmte Hemmkonstante  $K_i$  beträgt 40  $\mu\text{M}$ .

• Inhibitor F:  $\text{H}_2\text{N-RRRRRRRRR-CONH}_2$

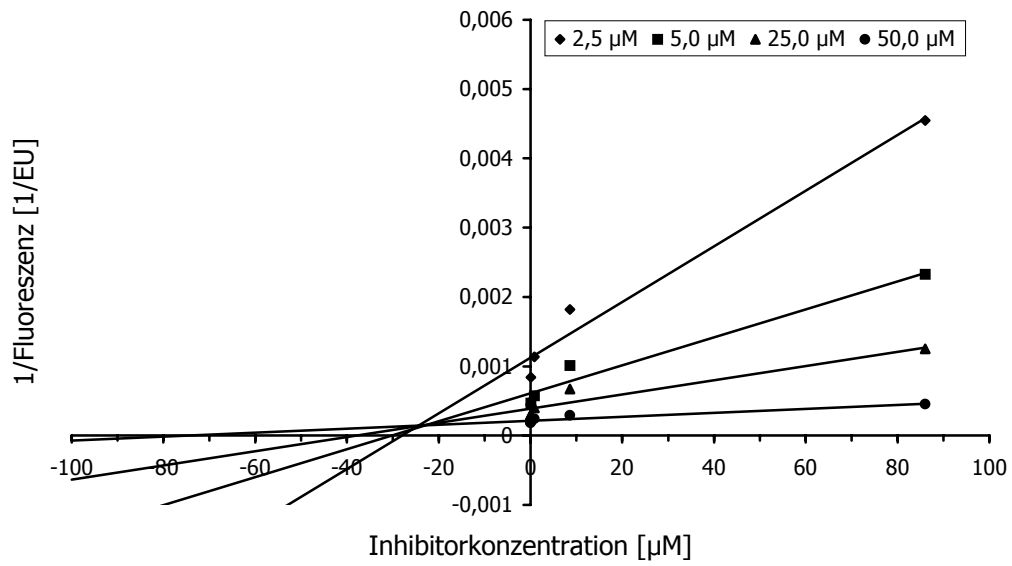


Abb. 34: Dixon-Plot von Inhibitor F. Die bestimmte Hemmkonstante  $k_i$  beträgt 25  $\mu\text{M}$ .

• Inhibitor G:  $\text{myristyl-RRRRRRRRR-CONH}_2$

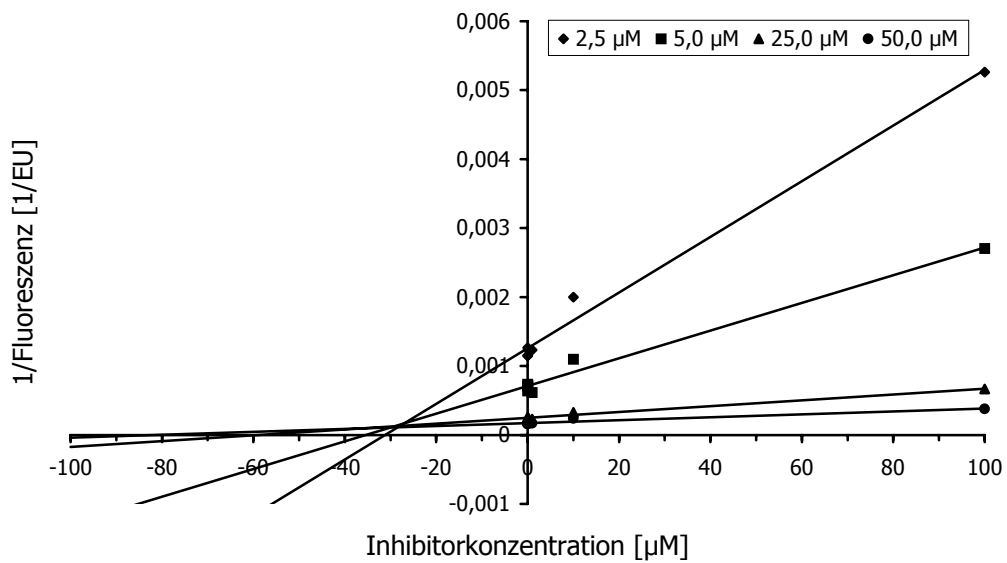


Abb. 35: Dixon-Plot von Inhibitor G. Die bestimmte Hemmkonstante  $k_i$  beträgt 30  $\mu\text{M}$ .

• **Inhibitor H:**      $\text{H}_2\text{N-PRHSRLQREPQVQWLEQQVAKRR}\underline{\text{TKR}}\text{-CONH}_2$

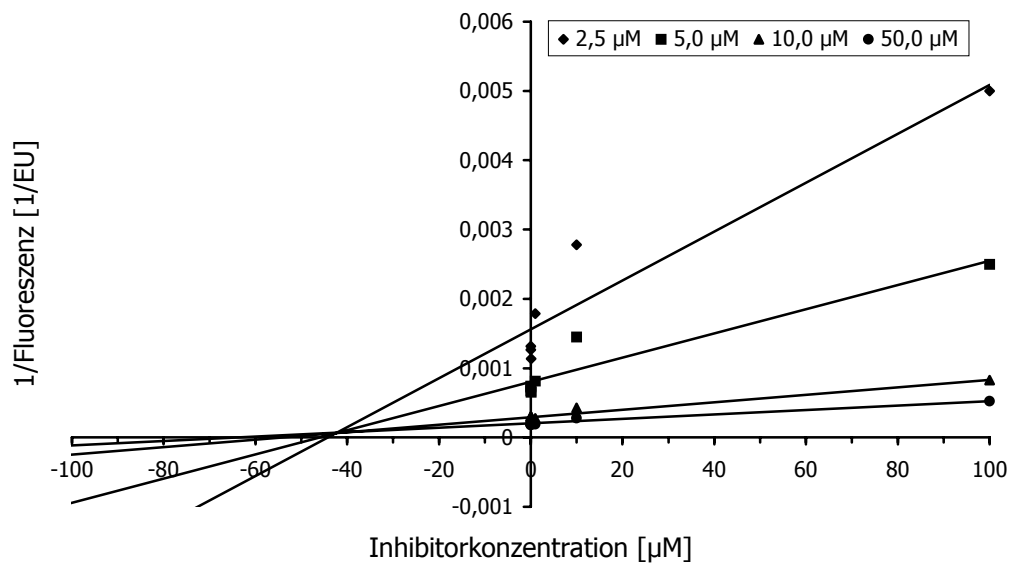


Abb. 36: Dixon-Plot von Inhibitor H. Die bestimmte Hemmkonstante  $k_i$  beträgt 40  $\mu\text{M}$ .

• **Inhibitor I:**      $\text{myristyl-PRHSRLQREPQVQWLEQQVAKRR}\underline{\text{TKR}}\text{-CONH}_2$

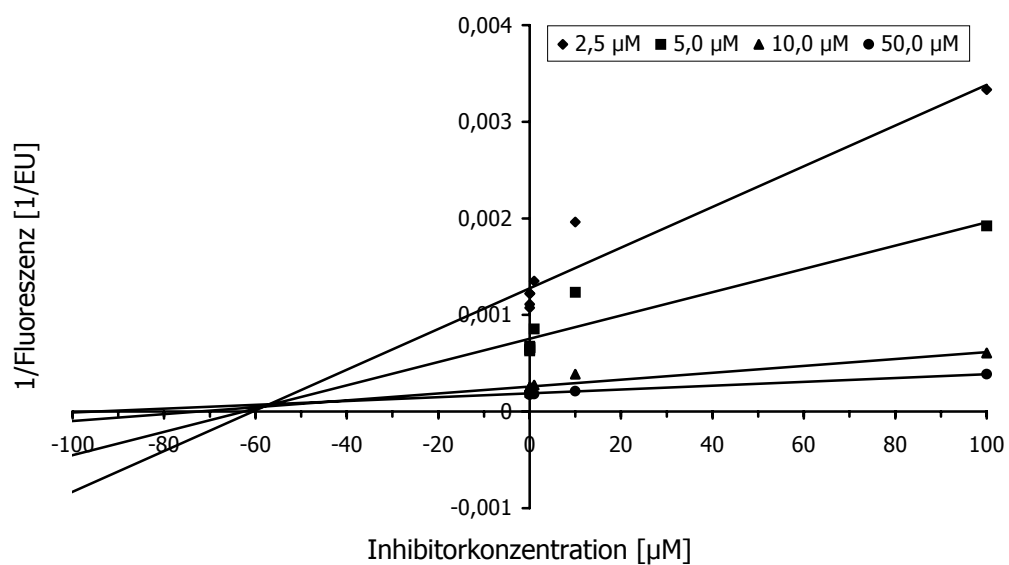


Abb. 37: Dixon-Plot von Inhibitor I. Die bestimmte Hemmkonstante beträgt 60  $\mu\text{M}$ .

• Inhibitor J:  $\text{H}_2\text{N-QQVAKRR}\underline{\text{TKR}}\text{-CONH}_2$

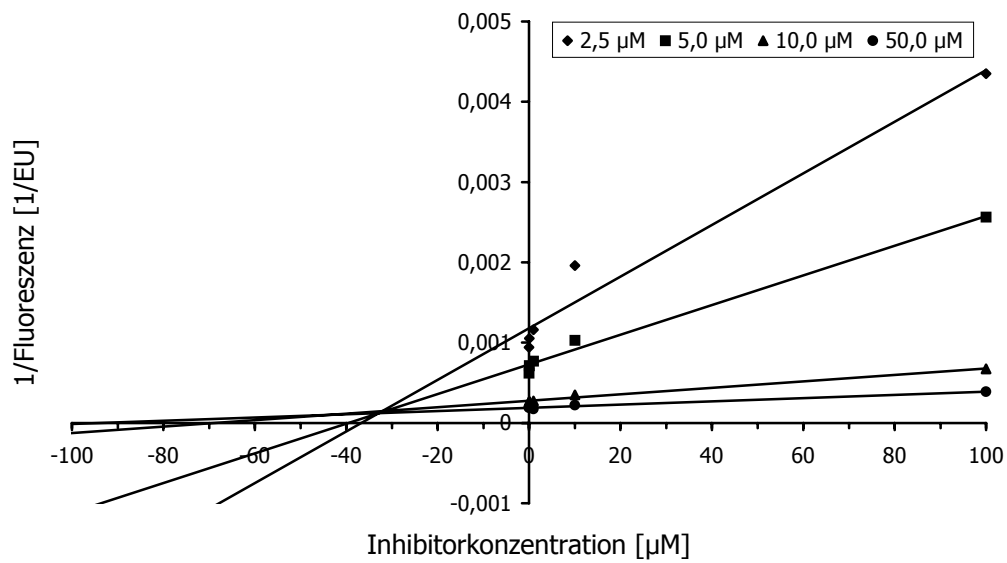


Abb. 38: Dixon-Plot von Inhibitor J. Die bestimmte Hemmkonstante  $k_i$  beträgt 30 μM.

• Inhibitor K:  $\text{myristyl-QQVAKRR}\underline{\text{TKR}}\text{-CONH}_2$

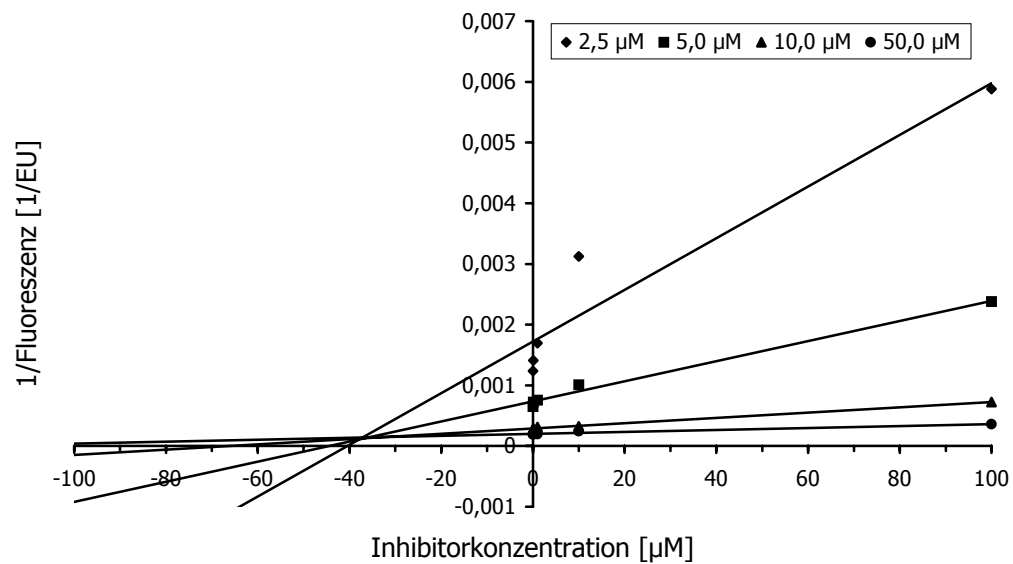


Abb. 39: Dixon-Plot von Inhibitor K. Die bestimmte Hemmkonstante  $k_i$  beträgt 40 μM.

#### 4.4.5 Dixon-Plot der bakteriell exprimierten und gereinigten SFurin-Prodomäne

Die Prodomäne von SFurin wurde bakteriell exprimiert und gereinigt (4.3). Die so erhaltene Proteinlösung wurde ebenfalls zu Inhibitorstudien eingesetzt. Die Aminosäuresequenz der Domäne ist in Kpt. 4.3 , Abb. 23 dargestellt.

• **Inhibitor:** SFurin Prodomäne

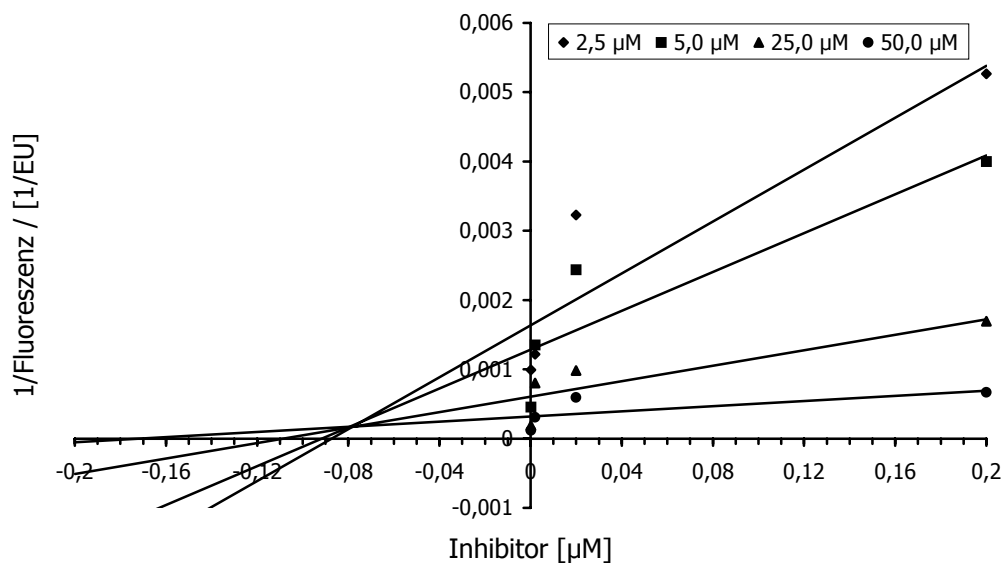


Abb. 40: Dixon-Plot der bakteriell exprimierten Prodomäne von SFurin. Die bestimmte Hemmkonstante  $k_i$  beträgt 75 nM.

#### 4.4.6 Zusammenfassung und Übersicht der gemessenen Hemmkonstanten

Die Inhibitoren A, C und die SFurin-Prodomäne zeigen Hemmkonstanten im Bereich von 30 bis 75 nM. Sie inhibieren die Furin-Aktivität sehr effizient. Alle anderen ermittelten Hemmkonstanten liegen zwischen 25 und 90 μM.

Eine Übersicht der mit Hilfe der Dixon-Plots bestimmten Hemmkonstanten  $k_i$  aller untersuchten Inhibitoren zeigt Tab. 6.



<b>Kurz- bezeichnung</b>	<b>Aufbau</b>	<b>ermittelte Hemmkonstante <math>k_i</math> [<math>\mu</math>M]</b>
<b>A</b>	dec-RVKR-cmk	<b>0,060</b>
<b>B</b>	dec-RVR <u>K</u> -cmk	<b>90</b>
<b>C</b>	biotinyl- $\epsilon$ -aminocaproyl-RVKR-cmk	<b>0,030</b>
<b>D</b>	H <sub>2</sub> N-HRYRVCRC-CONH <sub>2</sub>	<b>40</b>
<b>E</b>	H <sub>2</sub> N-LLRVKR-CONH <sub>2</sub>	<b>40</b>
<b>F</b>	H <sub>2</sub> N-RRRRRRRRR-CONH <sub>2</sub>	<b>25</b>
<b>G</b>	myristyl-RRRRRRRRR-CONH <sub>2</sub>	<b>30</b>
<b>H</b>	H <sub>2</sub> N-PRHSRLQREPQVQWLEQQVAKRRTKR-CONH <sub>2</sub>	<b>40</b>
<b>I</b>	myristyl-PRHSRLQREPQVQWLEQQVAKRRTKR-CONH <sub>2</sub>	<b>60</b>
<b>J</b>	H <sub>2</sub> N-QQVAKRRTKR-CONH <sub>2</sub>	<b>30</b>
<b>K</b>	myristyl-QQVAKRRTKR-CONH <sub>2</sub>	<b>40</b>
<b>SFur- Prodom.</b>	ISEFLPEPVYHDQFAVHVPAGPHHVDDIARRHGFEVNH GQIGSLKNYYLLSHHEVRKRSTEPSHEHHKKLNDEPQ VRWFEQQREKRRIKR	<b>0,075</b>

**Tab. 6: Übersicht der mittels Dixon-Plot bestimmten Hemmkonstanten der verschiedenen Peptid-Inhibitoren einschließlich der SFurin-Prodomäne.**

## 5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit *Spodoptera frugiperda* Furin (SFurin), einer von Cieplik, et al. 1998 beschriebenen, thermostabilen subtilisinähnlichen Endoprotease aus Insektenzellen. Die rekombinante Expression und Reinigung von katalytisch aktivem SFurin war die Grundlage der enzymatischen Charakterisierung des Enzyms. Es wurden 11 Peptidinhibitoren bezüglich der Hemmung des gereinigten SFurins untersucht und die Ergebnisse mit bereits publizierten Daten zur Inhibition von anderen Proproteinkonvertasen verglichen. Zusätzlich wurde die Prodomäne von *Spodoptera frugiperda* Furin bakteriell exprimiert und gereinigt. Zum einen wurde die Hemmwirkung der Prodomäne auf SFurin untersucht, zum anderen wurden Kristallisationsversuche zur Strukturaufklärung durchgeführt.

### 5.1 Expression und Reinigung von katalytisch aktivem SFurin

In der Veröffentlichung von Cieplik et al. 1998, in der *Spodoptera frugiperda* Furin identifiziert und grundlegend charakterisiert wurde, wurden zwei Formen von SFurin mittels rekombinanter Baculoviren exprimiert. Das native SFurin mit einer Länge von 1299 Aminosäuren und eine membranankerlose Form bestehend aus 1215 Aminosäuren. Diese beiden Formen von SFurin wurden von Cieplik et al. aus Zellkulturüberständen ankonzentriert und ohne vorhergehende Reinigung biochemisch analysiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Infektion von Sf9-Zellen rekombinante Baculoviren erzeugt, die den Teil des Gens von *Spodoptera frugiperda* Furin exprimieren, der zu einer sezernierten, nicht membranverankerten, katalytisch aktiven Form von Aminosäure 1 bis 700 der Insektenprotease führt und zusätzlich einen C-terminalen Polyhistidin-Rest trägt (Abb. 10). Die Infektion von Sf9- und High-Five™-Zellen mit den so erzeugten Baculoviren führte zu einer, im Vergleich zu Baculovirus-Wildtyp infizierten Zellen, stark erhöhten Furin-Aktivität.

Die chromatographische Reinigung des exprimierten SFurins aus dem Zellkulturüberstand erwies sich als nicht unproblematisch. Die Affinitätsreinigung des rekombinanten Proteins mittels einer mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen beladenen Affinitätssäule gelang weder aus dem Zellkulturüberstand noch nach Ammoniumsulfatfällung. Dafür könnte eine ungünstige Faltung des C-terminalen Endes oder eine unspezifische Interaktion mit anderen, im Zellkulturüberstand

vorhandenen Proteinen verantwortlich sein, die das Polyhistidin am Ende des Proteins abschirmten.

Da die Oberfläche ammoniumsulfatgefällter Proteine in der Regel hydrophob ist, wurde anstelle der Affinitätsreinigung eine hydrophobe Interaktionschromatographie mit unterschiedlichen Säulenmaterialien versucht. Jedoch zeigte dieser Ansatz nicht den erhofften Reinigungseffekt. Die Reinigung von SFurin gelang schließlich nach fraktionierter Ammoniumsulfatfällung, Anionenaustauschchromatographie und Ausschlußchromatographie, wonach eine Proteinfraction erhalten wurde, in der die spezifische Enzymaktivität um den Faktor 520 angereichert war.

Das katalytisch aktive SFurin wurde nach SDS-PAGE und Western-Blot Analyse erwartungsgemäß als Proteinbande von 70 kDa identifiziert. Die Bandenintensität der Fremdproteine im SDS-Polyacrylamidgel war gering, so daß im Verhältnis zum Zellkulturüberstand über 95 % der Fremdproteine entfernt wurden. Die spezifische Furin-Aktivität im Zellkulturüberstand und die Identifizierung des Enzyms der Größe 70 kDa beweisen, daß das exprimierte SFurin korrekt prozessiert und sezerniert wurde. Die Prozessierung beinhaltet die autokatalytische Abspaltung des Signalpeptids und der Prodomäne. Das exprimierte, katalytisch aktive SFurin ist 614 Aminosäuren lang und besteht aus der katalytischen Domäne sowie der Mitteldomäne des Enzyms.

## 5.2 Kinetische Charakterisierung von SFurin

Die kinetische Charakterisierung von SFurin bestand zum einen in der Bestimmung der Michaelis-Konstante  $k_M$ , zum anderen in der Untersuchung der Thermostabilität.

Der *in vitro* Fluoreszenz-Enzymaktivitätstest für SFurin basiert auf der Spaltung des Furin-Substrats Abz-RVKRGLAY(NO<sub>2</sub>)D-OH (Angliker et al., 1995). Angliker et al. schreiben, daß das von ihnen entwickelte Substrat im Gegensatz zu dem älteren Substrat Boc-RVRR-AMC 14 mal stärker an Furin bindet. In Enzymtests finden sie Michaelis-Konstanten für humanes Furin von 3,8 µM für Abz-RVKRGLAY(NO<sub>2</sub>)D-OH und 51,6 µM für Boc-RVRR-AMC.

Für das katalytisch aktive und gereinigte SFurin wurde mit dem Substrat Abz-RVKRGLAY(NO<sub>2</sub>)D-OH eine Michaelis-Konstante von  $k_M = 12 \mu\text{M}$  bestimmt. Der Vergleich mit der von Angliker et al. bestimmten Michaelis-Konstante für humanes Furin von  $k_M = 3,8 \mu\text{M}$  zeigt somit für SFurin eine nur ca. 3-fach geringere Bindungsstärke von Enzym

und Substrat. Auch der zeitliche Verlauf der Proteolyse, mit einer nahezu vollständigen Spaltung des Substrats nach ca. 20 min stimmt mit den Daten für humanes Furin überein, die unter ähnlichen Bedingungen ermittelt wurden.

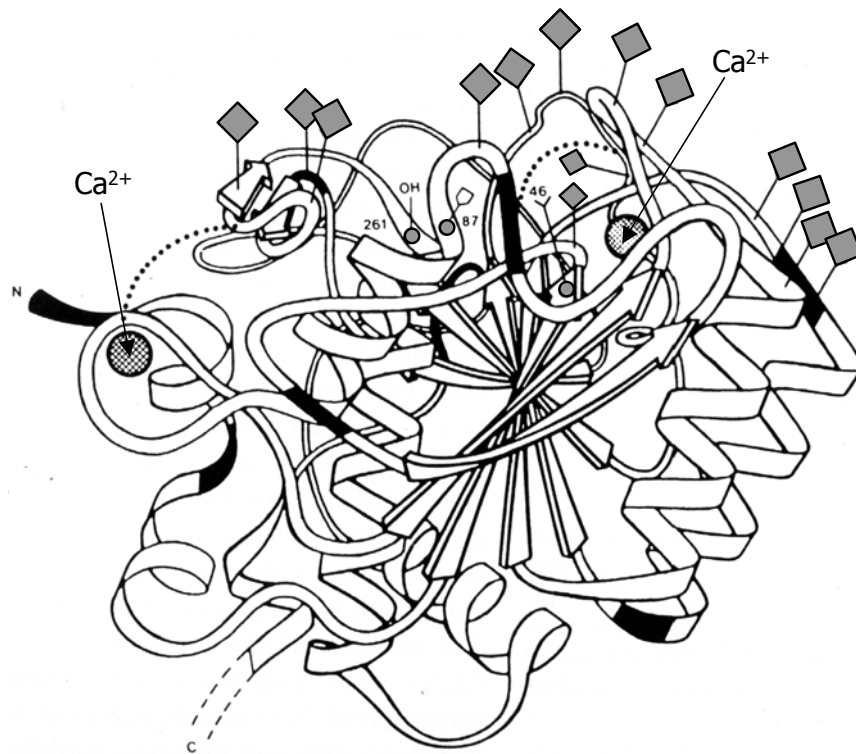
Die Thermostabilität von SFurin wurde durch Vorinkubation des Enzyms für 10 min bei Temperaturen zwischen 0°C und 79°C mit dem *in vitro* Fluoreszenz-Enzymaktivitätstest untersucht. Es zeigte sich, daß die SFurin-Aktivität bis 55°C nahezu unverändert ist. Bei einer Temperatur von 58°C sinkt die Aktivität auf 50 % und ab 61°C unter 20 % ab. Damit konnte auch die von Cieplik et al. beschriebene Thermostabilität von SFurin bis 60°C bestätigt werden. Dem gereinigten SFurin fehlt die gesamte cysteinreiche Domäne, die im nativen, membranverankerten SFurin mit 515 Aminosäuren vergleichsweise lang ist und einen Cysteingehalt von 16,3 % besitzt. Die Domäne enthält 9 hintereinanderliegende Cysteinemotive, die aus jeweils 8 Cysteinen mit definierten Abständen zueinander bestehen. Am Anfang und am Ende der Domäne liegen jeweils ein weiteres konserviertes Cysteinmotiv, bestehend aus 7 bzw. 5 Cysteinen, das in allen subtilisinähnlichen Endoproteasen mit ausgedehnter cysteinreicher Domäne vorkommt. Eine funktionelle Bedeutung konnte der cysteinreichen Domäne bisher jedoch nicht zugeordnet werden. Die Ausbildung zahlreicher Disulfidbrücken könnte einen strukturegebenden Einfluß haben. Für die Thermostabilität von *Spodoptera frugiperda* Furin ist sie jedoch nicht verantwortlich, da dem in dieser Arbeit untersuchten SFurin die gesamte cysteinreiche Domäne fehlt.

### 5.3 Hemmstudien von SFurin mittels zahlreicher Peptidinhibitoren

#### 5.3.1 Struktur der katalytischen Domäne von Furin

Bisher ist von Furin keine Kristallstruktur bekannt. Aufgrund der Homologie des aktiven Zentrums von Furin mit dem von Thermitase (Gros et al., 1989), Subtilisin Carlsberg (McPhalen and James, 1988) und Subtilisin BPN'<sup>4)</sup> (Bott et al., 1988) wurde von der katalytischen Domäne ein dreidimensionales Strukturmodell erstellt (Van de Ven et al., 1990; Siezen et al., 1994). Abb. 41 zeigt das Bändermodell der katalytischen Domäne von humanen Furin von Aminosäureposition 108 bis 437. In Analogie zu Thermitase befinden sich N-terminal zwei Ca<sup>2+</sup> Bindungsstellen. Die sechs in dem Modell enthaltenen Cysteine bilden zwei Disulfidbrücken, zwischen Cys<sup>104</sup> und Cys<sup>253</sup> sowie zwischen Cys<sup>196</sup> und Cys<sup>226</sup>

<sup>4)</sup> BPN': Bacillus Protease N' aus *Bacillus amyloliquefaciens*.

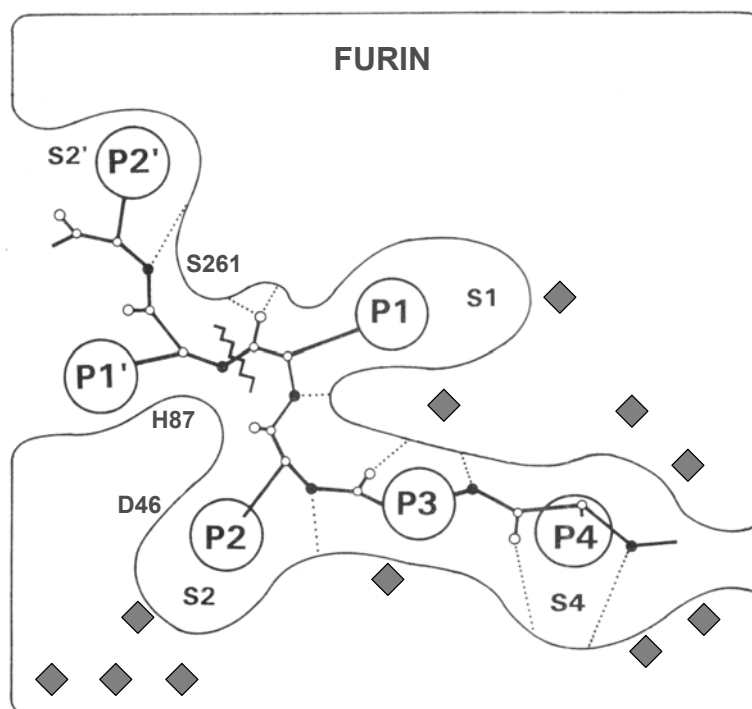


**Abb. 41: Dreidimensionales Bändermodell der katalytischen Domäne von humanem Furin.** Neben den katalytischen Aminosäuren Asp<sup>46</sup>, His<sup>87</sup> und Ser<sup>261</sup> sind an der oberen Substratbindungsstelle negativ geladene Seitengruppen dargestellt (*Karos*) sowie zwei Cysteinbrücken (*gestrichelte Linien*) und zwei Calciumionen (Siezen et al., 1994)<sup>5)</sup>.

(bzw. Cys<sup>198</sup> und Cys<sup>226</sup>, beide Zuordnungen sind möglich). Cystein<sup>91</sup> liegt als freies Thiol vor. Beide Disulfidbrücken stabilisieren jeweils eine Schleife. Die erste Schleife ist an der Calciumbindung beteiligt, die zweite an der Substratbindung. In Nachbarschaft zur Substratbindungsstelle befinden sich an der Oberfläche von Furin zahlreiche negativ geladene Aminosäuren, die bedingen, daß nur positiv geladene Substrate von Furin gespalten werden (Watanabe et al., 1993).

Anhand der dreidimensionalen Strukturvorhersage wurde die Substratbindungsstelle von Furin näher beschrieben. Sie ist in Abb. 42 schematisch dargestellt (Siezen et al., 1994). Die Abbildung zeigt die hohe negative Ladungsdichte des katalytischen Zentrums von Furin und die Lage eines multibasischen Substrats. Ein multibasisches Furin-Substrat der Form R-X-K/R-R würde in Abb. 42 die Positionen P4-P3-P2-P1 besetzen.

<sup>5)</sup> Die Aminosäureposition 108 des humanen Furins, mit der dieses Modell beginnt, erhält die Numerierung 1, so daß Asp<sup>46</sup>, His<sup>87</sup> und Ser<sup>261</sup> im nativen Protein den Positionen Asp<sup>153</sup>, His<sup>194</sup> und Ser<sup>368</sup> entsprechen.



**Abb. 42:** Schematische Darstellung eines Substrats/Inhibitors (*fette Linie*), gebunden an die Substratbindungsstelle von humanen Furin (*gewölbte Oberfläche*). Die Nomenklatur der Aminosäurepositionen des Substrats (*P4 bis P2'*) und der katalytischen Taschen von Furin (*S4 bis S2'*) bezieht sich auf Schechter und Berger, 1967. Die gezackte Linie zeigt die Position der zu spaltenden Peptidbindung des Substrats. Gestrichelte Linien stellen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Substrat und Furin dar. Die katalytischen Aminosäuren Asp<sup>46</sup>, His<sup>87</sup> und Ser<sup>261</sup> sind in ihrer Position im Protein eingezeichnet. Negativ geladene Seitengruppen sind in ihrer Position im Protein als Karos dargestellt.

Die Kenntnis der Struktur des katalytischen Zentrums ist hilfreich für die Suche nach neuen Inhibitoren. Dennoch sei darauf hingewiesen, daß bisher von Furin noch keine Kristallstruktur bekannt ist, wenngleich das Homologiemodell der Realität wahrscheinlich sehr nahe kommt.

### 5.3.2 Hemmung von SFurin mittels nicht kompetitiver Peptidinhibitoren

Kovalent bindende, substratanaloge Peptidylchloroalkylketone, wie Decanoyl-RVKR-Chloromethylketon wurden sowohl zur Hemmung von Furin *in vitro* als auch in Zellkultur erfolgreich eingesetzt (Stieneke-Gröber et al., 1992; Hallenberger et al., 1992). Die Spaltung zahlreicher viraler Glycoproteine lipidumhüllter Viren konnte gehemmt werden, so daß die Zell-Zellfusion und Replikation dieser Viren unterbunden wurde (zur Übersicht: Klenk und Garten, 1994; EINLEITUNG, 1.3.4).

Die Hemmung von SFurin wurde mittels drei verschiedener Peptidylchloromethylketone untersucht und deren Hemmkonstanten bestimmt (4.4.6, Tab. 3, A-C). Der Inhibitor dec-RVKR-cmk (A) zeigte bereits im nanomolaren Konzentrationsbereich vollständige Hemmung. Die gemessene Hemmkonstante  $k_i$  beträgt 60 nM. Die Bindung der biotinylierten Form des Inhibitors (C: biotiny- $\epsilon$ -aminocaproyl-RVKR-cmk) an SFurin war noch stärker. Für biotiny- $\epsilon$ -aminocaproyl-RVKR-cmk wurde eine Hemmkonstante  $k_i$  von 30 nM bestimmt. Eine Veränderung des Furinmotivs im Inhibitor, wie der Austausch von Lysin und Arginin in den Positionen P1 und P2, zeigt eine drastische Reduktion der Hemmwirkung. Der Inhibitor dec-RVRK-cmk (B) zeigt für SFurin eine Hemmkonstante von 90  $\mu$ M. Die Bindung dieses Inhibitors an SFurin ist mehr als 1000 fach schwächer. Für das von Cieplik et al. exprimierte SFurin wurde für den Inhibitor dec-RVKR-cmk nahezu vollständige Hemmung für eine Inhibitorkonzentration von 100 nM gefunden, für den Inhibitor dec-RVRK-cmk war eine vollständige Hemmung erst bei 1  $\mu$ M erreicht. Hemmkonstanten wurden jedoch von Cieplik et al. nicht bestimmt, so daß sich aus dem Vergleich der Ergebnisse nur dieselbe Tendenz ablesen läßt. Durch die Bestimmung der Hemmkonstanten mit Hilfe des spezifischeren *in vitro* Enzymaktivitätstests konnten die Ergebnisse präzisiert und mit anderen Inhibitoren verglichen werden (5.3.5).

### 5.3.3 Hemmung von SFurin mittels kompetitiver Peptidinhibitoren

Neben den zuvor diskutierten, kovalent bindenden Peptidylchloromethylketonen wurden fünf weitere, in der Aminosäuresequenz unterschiedliche Peptidinhibitoren untersucht und deren Hemmkonstanten bestimmt (4.4.6, Tab. 3, D-K). Diese Inhibitoren binden nicht kovalent an das katalytische Zentrum von Furin, ihr Hemmechanismus ist kompetitiv. Im Gegensatz zu den kovalent bindenden Chloromethylketonen wurde die kompetitive Bindung dieser Inhibitoren durch den Verlauf der Graphen der Dixon-Plots bestätigt, bei denen der

Schnittpunkt der Geraden auf der Abszisse liegt, wenn es sich um einen nicht kompetitiven Inhibitor, und deutlich oberhalb der Abszisse liegt, wenn es sich um einen kompetitiven Inhibitor handelt (4.4.3 – 4.4.5). Von den Inhibitoren F, H und J stand jeweils eine Variante zur Verfügung, die einen N-terminalen Myristyl-Rest trägt (G, I und K). Dieser hydrophobe Rest ermöglicht es einem Inhibitor *in vivo* leichter in zelluläre Membranen zu inserieren. Der Vergleich der Hemmkonstanten eines Inhibitors mit und ohne Myristylrest gibt Aufschluß darüber, ob sich die Inhibitionswirkung durch den N-terminalen Rest verändert.

Der Inhibitor H<sub>2</sub>N-HRYRVCRC-CONH<sub>2</sub> (D) beinhaltet zwei Arginine an Position –1 und –4 als minimale Voraussetzung, um von Furin als Substrat erkannt zu werden. Des weiteren enthält das Peptid ein Tyrosin, das eine UV-Detektion bei 280 nm ermöglicht und ein Histidin an seinem Ende, das bei vielen histidinreichen Inhibitoren in der Natur von Bedeutung ist (Basak et al., 1997). Die beiden Cysteine an Position +1 und –2 sollten den Einfluß von Cysteinen an diesen Positionen zeigen. Die erhaltene Hemmkonstante beträgt 40 µM. Damit stellt Inhibitor D keinen effizienten Inhibitor für SFurin dar. In der Literatur ist dieser Inhibitor nicht beschrieben.

Der Inhibitor H<sub>2</sub>N-LLRVKR-CONH<sub>2</sub> (E) wurde mittels einer kombinatorischen Peptidbibliothek als effizienter Inhibitor für die rekombinant exprimierten Prohormonkonvertasen 1 (PC1) und 2 (PC2) der Maus beschrieben (Apletalina et al., 1998). In den von Apletalina et al. durchgeführten Kinetikstudien wurde der Inhibitor in der acetylierten Form (Ac-LLRVKR-CONH<sub>2</sub>) eingesetzt. Für PC1 wurde eine Hemmkonstante  $k_i$  von 3,2 nM, und für PC2 von 360 nM bestimmt. Apletalina et al. bestimmten auch die Hemmkonstante des Inhibitors für die lösliche Form des humanen Furins und erhielten einen Wert von 1400 nM.

Der Inhibitor H<sub>2</sub>N-LLRVKR-CONH<sub>2</sub> (E) wurde zur Hemmung von SFurin eingesetzt. Die erhaltene Hemmkonstante beträgt 40 µM. SFurin wird damit von H<sub>2</sub>N-LLRVKR-CONH<sub>2</sub> ca. 30 mal schlechter gehemmt als die lösliche Form des humanen Furins mit Ac-LLRVKR-CONH<sub>2</sub>.

Nona-L-Arginin wurde als effizienter Inhibitor für rekombinant exprimiertes, lösliches Maus-Furin (*MFurin*) mit einer Hemmkonstante  $k_i$  von 40 nM beschrieben (Cameron et al., 2000). Von Cameron et al. wurden für Nona-L-Arginin die Hemmkonstanten für PC1 mit 12 µM und PACE4 mit 110 nM bestimmt. Der Vergleich der Daten mit den Ergebnissen dieser Arbeit zeigt, daß bezüglich der Affinität von Nona-L-Arginin SFurin eine Sonderstellung einnimmt, da die hier untersuchten Inhibitoren H<sub>2</sub>N-RRRRRRRRR-CONH<sub>2</sub> (F) und myristyl-RRRRRRRRR-CONH<sub>2</sub> (G) SFurin nur schwach hemmen. Die Hemm-



konstanten betragen 25  $\mu\text{M}$  und 30  $\mu\text{M}$ . Die Myristylierung hat demnach keinen Einfluß auf die Bindungsstärke des Inhibitors an das katalytische Zentrum von SFurin.

Die Inhibitoren H und I sowie J und K haben eines gemeinsam: ihre Sequenz geht aus dem C-terminalen Ende der Prodomäne des humanen Furins (*HFurin*) hervor. Die Inhibitoren H und I besitzen die letzten 26 Aminosäuren ( $^{82}\text{PRHSRLQREPQVQWLEQQVAKRRRTKR}^{107}$ ) und die Inhibitoren J und K die letzten 10 Aminosäuren ( $^{98}\text{QQVAKRRRTKR}^{107}$ ) der HFurin-Prodomäne <sup>6)</sup>. Die Prodomänen von humanen Furin und der Proproteinkonvertase 7 (*PC7*) sowie verkürzte Formen davon wurden als Inhibitoren untersucht (Zhong et al., 1999). Zhong et al. beschreiben die Hemmung von HFurin mit der nativen HFurin Prodomäne im nanomolaren Bereich, ein  $k_i$ -Wert wurde nicht bestimmt. Für das den Inhibitoren J und K entsprechende Peptid bestimmten Zhong et al. eine Hemmkonstante von 40 nM für HFurin und ca. 500 nM für PC7. In einer weiteren Veröffentlichung wurde gezeigt, daß die letzten 24 C-terminalen Aminosäuren der PC7 Prodomäne in der Lage sind PC7 mit einer Hemmkonstante von 7 nM ebenso effizient zu hemmen wie die gesamte Prodomäne bestehend aus 104 Aminosäuren (Bhattacharjya et al., 2000a).

Die Hemmung von SFurin, durch die auf der humanen Prodomäne basierenden Inhibitoren H, I, J und K, stellt sich wie folgt dar: für den Inhibitor  $\text{H}_2\text{N-PRHSRLQREPQVQWLEQQVAKRRRTKR-CONH}_2$  (H) ergibt sich ein  $k_i$ -Wert von 40  $\mu\text{M}$ , für die myristylierte Form  $\text{myristyl-PRHSRLQREPQVQWLEQQVAKRRRTKR-CONH}_2$  (I) ein  $k_i$ -Wert von 60  $\mu\text{M}$ . Geringfügig stärker bindet die kürzere Sequenzfolge in Gestalt des Inhibitors  $\text{H}_2\text{N-QQVAKRRRTKR-CONH}_2$  (J) mit einem  $k_i$ -Wert von 30  $\mu\text{M}$  und der analogen myristylierten Form  $\text{myristyl-QQVAKRRRTKR-CONH}_2$  (K) mit einem  $k_i$ -Wert von 40  $\mu\text{M}$ . Bei beiden Inhibitorpaaren hat die Myristylierung eine nur geringfügig schlechtere Inhibitorwirkung zur Folge. Der Vergleich der Ergebnisse von Zhong et al., 1999 mit den ermittelten Hemmkonstanten der vorliegenden Arbeit zeigt, daß die Inhibitoren H bis K SFurin ca. 1000 mal schlechter inhibieren als HFurin und ca. 100 mal schlechter als PC7. Eine Übersicht der vergleichend diskutierten Hemmkonstanten gibt Tab. 7.

<sup>6)</sup>Die Zahlenangaben entsprechen der Aminosäureposition im humanen Furin.

Kurz-bezeichnung	Inhibitor	gemessene $k_i$ -Werte [ $\mu$ M]	Literatur- $k_i$ -Werte [ $\mu$ M]
D	HRYRVCRC	40	---
E	LLRVKR	40	PC1 0,0032 PC2 0,360 HFurin 1,400
F, G	RRRRRRRRR	25 – 30	MFurin 0,040 PC1 0,012 PACE4 0,110
H, I	PRHSRLQREPQVQWLEQQVAKRRTKR	40 – 60	---
J, K	QQVAKRRTKR	30 – 40	HFurin 0,040 PC7 0,500
---	SFurin-Prodomäne	0,075	---

Tab. 7: Vergleich der Hemmkonstanten der getesteten kompetitiven Inhibitoren, zu denen auch die SFurin-Prodomäne zählt (5.3.4), mit denen aus der Literatur (*Literaturangaben siehe Text*).

### 5.3.4 Inhibition von SFurin mit der bakteriell exprimierten und gereinigten SFurin-Prodomäne

Die Prodomäne von *Spodoptera frugiperda* Furin wurde bakteriell exprimiert und gereinigt mit dem Ziel, sie als potentiellen Inhibitor für SFurin einzusetzen und zu charakterisieren. Die Prodomäne von SFurin enthält kein Cystein und die 8 letzten, C-terminalen Aminosäuren stellen gleich zwei klassische, mehrbasige Furin-Spaltmotive der Form R-X-K/R-R dar (Abb. 43). *In vivo* wird an dieser Stelle die Prodomäne des Vorläufermoleküls im endoplasmatischen Retikulum (ER) abgespalten. Innerhalb der Sequenz befinden sich wiederum zwei dibasische Motive der Form R-R und K-R. Diese sind wahrscheinlich zur Spaltung der Prodomäne im Reifungsprozeß des nativen Proteins auf seinem Weg durch den Golgi-Apparat notwendig. Im ungespaltenen Zustand ist die Prodomäne mit dem katalytische Zentrum des Proteins assoziiert und inhibiert die enzymatische Aktivität (Vey et al., 1994; Nakayama, 1997; Khan et al., 1998). Erst die Spaltung führt zur Dissoziation der Prodomäne

und Furin wird katalytisch aktiv.

Wird die komplette Prodomäne von SFurin unter den gleichen Bedingungen wie die zuvor getesteten Inhibitoren zu *in vitro* Inhibitionsversuchen eingesetzt, so ist die Domäne ein sehr starker Inhibitor für SFurin mit einer Hemmkonstante  $k_i = 75$  nM. Wie gezeigt, wurde für den kovalent bindenden Inhibitor dec-RVKR-cmk (A) ein  $k_i$ -Wert von 60 nM bestimmt (5.3.2).

### 5.3.5 Vergleich der Hemmkonstanten

Die Hemmung von HFurin mit der nativen HFurin Prodomäne ist ebenfalls sehr stark, und obwohl ein  $k_i$ -Wert nicht bestimmt wurde, wurde ein  $IC_{50}$ -Wert von 4 nM ermittelt (Zhong et al., 1999). Der Sequenzvergleich von HFurin und SFurin zeigt auf Aminosäureebene für die katalytische Domäne eine Homologie von 72 %, für die Mitteldomäne von 35 %. Selbst in diesen Domänen, in denen hochkonservierte Bereiche enthalten sind, unterscheidet sich Furin aus dem Menschen von dem aus *Spodoptera frugiperda* deutlich.

Abb. 43 zeigt, daß die Homologie der Prodomänen zwischen HFurin und SFurin auf Aminosäureebene 47 % beträgt. Die Identität der letzten 26 Aminosäuren, die der Sequenz des Inhibitorpaars H und I entsprechen, beträgt 62 %. Für die letzten 10 Aminosäuren, die der Sequenz des Inhibitorpaars J und K entsprechen, beträgt sie 70 %. Sehr effiziente Inhibitoren für HFurin inhibieren nicht im selben Maß auch SFurin. Der Sequenzunterschied von 30 bis 40 % ist demnach ausreichend, um keine spezifische Hemmung zu erreichen. Ebenso ist die

<b>SFurin</b>	LPEPVYHDQFAVHVPAAGPHHVDDIARRHG FVNHGQIGSLKNYYLLSHHEVVRKRSTEPSHEH	
<b>HFurin</b>	~GQKVFTNTWAVRI PGGPAVANSVARKHGFLNLGQI~FGDYHFWHRGVTKRSLSPHRPR	
<b>SFurin</b>	HKKLND EPQVRWFEQQREKRR IKR	(85 Aminosäuren)
<b>HFurin</b>	HSRLQRE PQVQWLEQQVAKRR TKR	(82 Aminosäuren)

**Abb. 43: Vergleich der Aminosäuresequenz der Prodomäne von humanem Furin (HFurin) und *Spodoptera frugiperda* Furin (SFurin).** Die Prodomäne von SFurin ist 85, die von HFurin 82 Aminosäuren lang. Zur Gegenüberstellung beider Sequenzen wurden an drei Stellen in der HFurin Sequenz Platzhalter ~ eingefügt. Die Identität auf Aminosäureebene zwischen SFurin und HFurin beträgt 47 %. Die Identität für die letzten 26 Aminosäuren beträgt 62 %, für die letzten 10 Aminosäuren 70 %.

geringe Affinität der anderen, nicht kovalent-bindenden Inhibitoren (D, E, F und G) mit Hemmkonstanten zwischen 25 und 40  $\mu\text{M}$  zu erklären. Nicht die Substratspezifität für das Motiv R-X-K/R-R, aber die Sequenzunterschiede und damit die Variationen in Faltung und dreidimensionaler Struktur der katalytischen Domäne sind ausreichend, um die Bindungskonstante eines Peptidinhibitors für ein bestimmtes Enzym aus unterschiedlichen Organismen um den Faktor 1000 variieren zu lassen.

Die beiden Peptidyl-Chloromethylketone dec-RVKR-cmk (A) und biotiny- $\epsilon$ -aminocaproyl-RVKR-cmk (C) stellen sehr effiziente Inhibitoren sowohl für SFurin als auch für humanes Furin dar. Das aus vier Aminosäuren bestehende Peptid der Form R-X-K-R, das als klassisches Furin Erkennungsmotiv gilt und die kovalente Bindung dieser Inhibitoren an das katalytische Zentrum von Furin sind für die niedrigen Hemmkonstanten von 60 nM (A) und 30 nM (B) verantwortlich. Nachteil dieser sehr effizienten Inhibitoren ist ihre hohe Cytotoxizität aufgrund der hoch reaktiven Chloromethylketon-Gruppe. Damit scheiden sie als mögliche virale Therapeutika aus, sind jedoch sehr hilfreich für *in vitro* und auch *in vivo* Hemmstudien, bei denen diese Inhibitoren in sehr geringen Konzentrationen erfolgreich eingesetzt werden können.

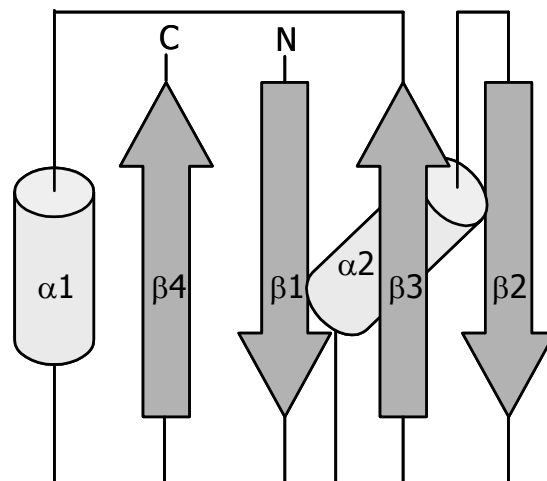
#### **5.4 Kristallisation der Prodomäne von SFurin – Bedeutung der dreidimensionalen Struktur der Domäne**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Prodomäne von SFurin in *E. coli* rekombinant überexprimiert und säulenchromatographisch in einer Reinheit von über 95 % isoliert. Aus der effizienten Inaktivierung von SFurin kann geschlossen werden, daß die SFurin-Prodomäne funktionell aktiv ist. Dies deutet auf eine native Faltung der rekombinant exprimierten Domäne hin. Bisher gibt es keine Publikationen über die Kristallisation von Furin oder einer Furindomäne. In dieser Arbeit wurden zwei Kristallformen bei unterschiedlichen Pufferbedingungen erhalten: Nadeln und kompakte Einkristalle. Die Größe der Kristalle ist mit einer maximalen Ausdehnung von 20  $\mu\text{m}$  noch gering. Für die Untersuchung im Röntgenstrahl müssen größere Kristalle erhalten werden.

Die Kristallisation und Strukturaufklärung der Prodomäne sind ein erfolgversprechender Ansatz, Leitstrukturen für Furininhibitoren zu gewinnen. Mit Ausnahme der stark inhibierenden Peptidyl-Chloromethylketone der Form dec-RXKR-cmk, die stets ein Tetrapeptid einer Furinkonsensussequenz enthalten, spielt die Faltung und damit die

dreidimensionale Struktur kompetitiver längerer Peptidinhibitoren eine entscheidende Rolle für ihre Hemmwirkung. Dies basiert auf der Vorstellung, daß diese Inhibitoren, ebenso wie die gefaltete Prodomäne, mit den negativ geladenen exponierten Aminosäuren in der Umgebung des aktiven Zentrums von Furin spezifisch in Wechselwirkung treten und damit die Substratbindungsstelle blockieren (Abb. 41, 42).

Im Gegensatz zu Furin ist von dem Komplex aus Subtilisin und der 77 Aminosäuren langen Subtilisin-Prodomäne eine Röntgenstruktur mit einer Auflösung von 2,0 Å bekannt (Bryan et al., 1995). Dabei zeigte sich, daß die Subtilisin-Prodomäne im Komplex mit Subtilisin aus vier antiparallel verlaufenden  $\beta$ -Faltblattstrukturen und zwei  $\alpha$ -Helices besteht (Abb. 44), mit denen sie wiederum an zwei  $\alpha$ -Helices an der Oberfläche des Subtilisins bindet. Der C-Terminus der Prodomäne bindet in der katalytischen Tasche des Subtilisins und inhibiert das Enzym. Bryan et al. beschrieben, daß die Subtilisin-Prodomäne allein bei einer Temperatur von 25°C ungefaltet ist und erst in Gegenwart von Subtilisin, d. h. im Komplex, die zuvor beschriebene Struktur annimmt.



**Abb. 44:** Schematische Darstellung der Faltung der Subtilisin Prodomäne. Sie besteht aus vier antiparallel verlaufenden  $\beta$ -Faltblattstrukturen (Pfeile:  $\beta 1$  bis  $\beta 4$ ) und zwei  $\alpha$ -Helices (Zylinder:  $\alpha 1$  und  $\alpha 2$ ).

Untersuchungen mittels Kernresonanz (NMR)-Spektroskopie ( $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) der bakteriell exprimierten Prodomäne von humanem Furin zeigten, daß die Domäne bei einer Temperatur von 25°C in Lösung, analog zur Subtilisin-Prodomäne, ungefaltet ist (Bhattacharjya et al., 2000b). Allerdings wurden diese Untersuchungen in 50 mM Natriumacetat-Puffer bei einem pH-Wert von 4,0 durchgeführt. Die Autoren begründen den Einsatz dieser sauren Puffer-

bedingung nicht, die sich von dem pH-Wert Bereich 7,0 bis 8,5 anderer Veröffentlichungen stark unterscheidet. Der ungefaltete Zustand der HFurin-Prodomäne bei leicht sauren pH-Werten ist zu erwarten, da bekannt ist, daß im Zuge der Proteinreifung des Furins der niedrige pH-Wert des Golgi-Apparats zur Spaltung innerhalb der Prodomäne nach einem dibasischem Motiv, und anschließend zur Dissoziation der Prodomäne führt (EINLEITUNG, 1.3.1). Der Einfluß des pH-Werts auf die Struktur der Prodomäne wurde ebenfalls von Bhattacharjya et al., 2001 anhand neuer NMR-spektroskopischer Untersuchungen beschrieben. Die zuvor diskutierten Überlegungen des Übergangs der HFurin-Prodomäne von einem gefalteten zu einem ungefalteten Zustand bei einer pH-Wert Änderung in den sauren Bereich werden durch diese experimentellen Daten unterstützt.

Ein weiteres Beispiel der strukturellen Eigenständigkeit der Prodomäne einer Protein-konvertase zeigten die Untersuchungen u. a. mittels NMR-Spektroskopie der in *E. coli* rekombinant exprimierten Prodomäne von PC-1 aus der Maus (Tangrea et al., 2001). Diese bildet eine zur Subtilisin-Prodomäne ähnliche Struktur, bestehend aus vier antiparallel verlaufenden  $\beta$ -Faltblattstrukturen und zwei  $\alpha$ -Helices (Abb. 44), die bei pH 7,0 bis 39°C stabil ist.

Es ist zu hoffen, daß mit der Röntgenstrukturuntersuchung größerer, gemäß dieser Arbeit erzeugter kompakter Einkristalle der SFurin-Prodomäne bei einem pH-Wert von 7,5 die Struktur der Domäne bei neutralem pH-Wert zu lösen ist und die daraus gewonnenen Erkenntnisse zu neuartigen Peptidinhibitoren für Furin führen, die zukünftig zur antiviralen Therapie eingesetzt werden können.

## 6 Zusammenfassung

Die Familie der subtilisinähnlichen eukaryontischen Endoproteasen besteht bisher aus sieben Vertretern, von denen Furin als Erste identifiziert wurde. Neben einer Vielzahl von zellulären Proenzymen und bakteriellen Exotoxinen ist Furin in der Lage, zahlreiche virale Glykoproteine C-terminal des mehrbasigen Motivs R-X-K/R-R zu spalten und zu aktivieren. Furin ist evolutionär weit verbreitet und wurde 1998 auch in den Insektenlarven von *Spodoptera frugiperda* identifiziert.

In der vorliegenden Arbeit war dieses, noch wenig untersuchte Furin aus *Spodoptera frugiperda* (SFurin), Ausgangspunkt zweier Ansätze. Zum einen wurden die ersten 700 Aminosäuren von SFurin mittels rekombinanter Baculoviren exprimiert, zum anderen wurde das Propeptid von SFurin in *E. coli* rekombinant exprimiert. Beide rekombinanten Proteine wurden säulenchromatographisch gereinigt. Die mittels Baculoviren exprimierte lösliche Form des SFurins bestand aus der katalytischen Domäne und der Mitteldomäne des Enzyms und war katalytisch aktiv. Die Kinetik der katalysierten Spaltung eines Substrats wurde mit Hilfe eines *in vitro* Fluoreszenz-Enzymaktivitätstests untersucht. Insgesamt elf verschiedene, kompetitiv- und nicht kompetitiv hemmende Peptidinhibitoren wurden bezüglich der Hemmung des exprimierten SFurins untersucht. Auch die gereinigte Prodomäne wurde als Inhibitor getestet. Zur Untersuchung ihrer Struktur konnte die Prodomäne kristallisiert werden.

Die Inhibitionsstudien ergaben, daß neben den Peptidylchloromethylketonen auch die Prodomäne von SFurin die Enzymaktivität des exprimierten SFurins im nanomolaren Konzentrationsbereich sehr effizient hemmt. Die Inhibitionswirkung der sehr unterschiedlichen übrigen Peptidinhibitoren lag im mikromolaren Konzentrationsbereich. Diese Ergebnisse wurden mit Hemmstudien anderer Proteinkonvertasen verglichen. Die Konformation der Prodomäne und damit ihre dreidimensionale Struktur sind ausschlaggebend für ihre sehr effiziente Hemmwirkung. Mit der in dieser Arbeit beschriebenen Kristallisation der SFurin Prodomäne ist ein wichtiger Schritt in Richtung Strukturaufklärung gelungen, die die Voraussetzung für das Verständnis der Interaktion der Prodomäne mit dem katalytischen Zentrum von SFurin bildet.

## 7 Literaturverzeichnis

- Anglikar, H., Neumann, U., Molloy, S. S., and Thomas, G. (1995). Internally quenched fluorogenic substrate for furin. *Analyt. Biochem.* **224**, 409-412.
- Apletalina, E., Appel, J., Lamango, N. S., Houghten, R. A., Lindberg, I. (1998). Identification of inhibitors of prohormone convertases 1 and 2 using a peptide combinatorial library. *Biol. Chem.* **273**, 26589-26595.
- Barr, P. J., Mason, O. B., Landsberg, K. E., Wong, P. A., Kiefer, M. C., Brake, A. J. (1991). cDNA and gene structure for a human subtilisin-like protease with cleavage specificity for paired basic amino acid residues. *DNA Cell Biol.* **10**, 319-328.
- Basak, A., Ernst, B., Brewer, D., Seidah, N. G., Munzer, J. S., Lazure, C., Lajoie, G. A. (1997). Histidine-rich human salivary peptides are inhibitors of proprotein convertases furin and PC7 but act as substrates for PC1. *J. Pept. Res.* **49**, 596-603.
- Bhattacharjya, S., Xu, P., Zhong, M., Chretien, M., Seidah, N. G., Ni, F. (2000a). Inhibitory activity and structural characterization of a C-terminal peptide fragment derived from the prosegment of the proprotein convertase PC7. *Biochem.* **39**, 2868-2877.
- Bhattacharjya, S., Xu, P., Ni, F. (2000b). Sequence-specific  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$  and  $^{13}\text{C}$  resonance assignments of the inhibitory prodomain of human furin. *J. Biomol. NMR* **16**, 275-276.
- Bhattacharjya, S., Xu, P., Xiang, H., Chretien, M., Seidah, N. G., Ni, F. (2001). pH-induced conformational transitions of a molten-globule-like state of the inhibitory prodomain of furin: implications for zymogen activation. *Protein Sci.* **10**, 934-942.
- Bergeron, F., Leduc, R., Day, R. (2000). Subtilase-like pro-protein convertases: from molecular specificity to therapeutic applications. *J. Mol. Endocrinol.* **24**, 1-22.
- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Bosshart, H., Humphrey, J., Deignan, E., Davidson, J., Drazba, J., Yuan, L., Oorschot, V., Peters, P., and Bonifacino, J. S. (1994). The cytoplasmic domain mediates localization of furin to the *trans*-Golgi network en route to the endosomal/lysosomal system. *J. Cell Biol.* **126**, 1157-1172.
- Bott, R., Ultsch, M., Kossiakoff, A., Graycar, T., Katz, B., Power, S. (1988). The three-dimensional structure of *Bacillus amyloliquefaciens* subtilisin at 1.8 Å and an analysis of the structural consequences of peroxide inactivation. *J. Biol. Chem.* **263**, 7895-7906.



- Bresnahan, P. A., Leduc, R., Thomas, L., Thorner, J., Gibson, H. L., Brake, A. J., Barr, P. J., Thomas, G.** (1990). Human fur gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro- $\beta$ -NGF *in vivo*. *J. Cell. Biol.* **111**, 2851-2859.
- Bryan, P., Pantoliano, M. W., Quill, S. G., Hsiao, H. Y., Poulos, T.** (1986). Site-directed mutagenesis and the role of the oxyanion hole in subtilisin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 3743-3745.
- Bryan, P., Wang, L., Hoskins, J., Ruvinov, S., Strausberg, S., Alexander, P., Almog, O., Gilliland, G., Gallagher, T.** (1995). Catalysis of a protein folding reaction: mechanistic implications of the 2.0 Å structure of the subtilisin-prodomain complex. *Biochem.* **34**, 10310-10318.
- Cameron, A., Appel, J., Houghten, R. A., Lindberg, I.** (2000). Polyarginines are potent furin inhibitors. *J. Biol. Chem.* **275**, 36741-36749.
- Chung, C. T., Niemela, S. L., Miller, R. H.** (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2172-2175.
- Cieplik, M., Klenk, H.-D., and Garten, W.** (1998). Identification and characterization of *Spodoptera frugiperda* Furin: a thermostable subtilisin-like endoprotease. *Biol. Chem.* **379**, 1433-1440.
- Constam, D. B., Calfon, M., Robertson, E. J.** (1996). SPC4, SPC6, and the novel protease SPC7 are coexpressed with bone morphogenetic proteins at distinct sites during embryogenesis. *J. Cell Biol.* **134**, 181-191.
- Cordingley, M. G., Callahan, P. L., Sardana, V. V., Garsky, V. M.** (1990). Substrate requirements of human rhinovirus 3C protease for peptide cleavage *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **265**, 9062-9065.
- Creemers, J. W. M., Vey, M., Schäfer, W., Ayoubi, T. A. Y., Roebroek, A. J. M., Klenk, H.-D., Garten, W., and Van de Ven, W. J. M.** (1994). Endoproteolytic cleavage of its propeptide is a prerequisite for efficient transport of furin out of the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **270**, 2695-2702.
- Denault, J. B., Leduc, R.** (1996). Furin/PACE/SPC1: a convertase involved in exocytic and endocytic processing of precursor proteins. *FEBS Lett.* **379**, 113-116.
- De Strooper, B., Creemers, J. W., Moechars, D., Huylebroeck, D., Van De Ven, W. J., Van Leuven, F., Van den Berghe, H.** (1995). Amyloid precursor protein is not processed by furin, PACE 4, PC1/3, PC2, PC4 and PC5/6 of the furin family of proprotein processing enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* **1246**, 185-188.
- Eskeland, N. L., Zhou, A., Dinh, T. Q., Wu, H., Parmer, R. J., Mains, R. E., and O'Connor, D. T.** (1996). Chromogranin A processing and segregation: specific role of endogenous and exogenous prohormone convertases in the regulated secretory pathway. *J. Clin. Invest.* **98**, 148-156.

- Feldmann, A.** (1995). Gallus gallus mRNA for *trans*-Golgi network protease furin. *EMBL/GenBank Database*, ID GGTGFURIN, AC Z68093.
- Fuller, R. S., Brake, A. J., and Thorner, J.** (1989). Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing endoprotease. *Science* **246**, 482-486.
- Garred, O., van Deurs, B., and Sandvig, K.** (1995a). Furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin. *J. Biol. Chem.* **270**, 10817-10821.
- Garred, O., Dubinina, E., Holm, P. K., Olsnes, S., van Deurs, B., Kozlov, J. V., Sandvig, K.** (1995b). Role of processing and intracellular transport for optimal toxicity of Shiga toxin and toxin mutants. *Exp. Cell. Res.* **218**, 39-49.
- Garten, W., Stieneke, A., Shaw, E., Wikstrom, P., Klenk, H.-D.** (1989). Inhibition of proteolytic activation of influenza virus hemagglutinin by specific peptidyl chloroalkyl ketones. *Virology* **172**, 25-31.
- Garten, W., Vey, M., Ohuchi, R., Ohuchi, M., Klenk, H.-D.** (1991). Modification of the cleavage activation of the influenza virus hemagglutinin by site-specific mutagenesis. *Behring Inst. Mitt.* **89**, 12-22.
- Garten, W., Hallenberger, S., Ortmann, D., Schäfer, W., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E., Klenk, H.-D.** (1994). Processing of viral glycoproteins by the subtilisin-like endoprotease furin and its inhibition by specific peptidylchloroalkylketones. *Biochimie* **76**, 217-225.
- Garten, W., Feldmann, A., Hallenberger, S., Sordel, M., Weigel, S., Schäfer, W., Stroh, A., Berghöfer, S., and Klenk, H.-D.** (1996). Hemagglutinin cleavage and host range: cleavage of fowl plaque virus hemagglutinin by subtilisin-like host proteases. *Options for the control of Influenza III*, 447-454.
- Gomez-Saladin, E., Luebke, A. E., Wilson, D. L., Dickerson, I. M.** (1997). Isolation of a cDNA encoding a KEX2-like endoprotease with homology to furin from the nematode *Caenorhabditis elegans*. *DNA Cell Biol.* **16**, 663-669.
- Gotoh, B., Ohnishi, Y., Inocencio, N. M., Esaki, E., Nakayama, K., Barr, P. J., Thomas, G., Nagai, Y.** (1992). Mammalian subtilisin-related proteinases in cleavage activation of the paramyxovirus fusion glycoprotein: superiority of furin/PACE to PC2 or PC1/PC3. *J. Virol.* **66**, 6391-6397.
- Gros, P., Betzel, C., Dauter, Z., Wilson, K. S., Hol, W. G.** (1989). Molecular dynamics refinement of a thermolysin-eglin-c complex at 1.98 Å resolution and comparison of two crystal forms that differ in calcium content. *J. Mol. Biol.* **210**, 347-367.
- Hallenberger, S., Bosch, V., Angliker, H., Shaw, E., Klenk, H.-D., Garten, W.** (1992). Inhibition of furin-mediated cleavage activation of HIV-1 glycoprotein gp160. *Nature* **360**, 358-361.

- Hallenberger, S., Moulard, M., Sordel, M., Klenk, H.-D., Garten, W.** (1997). The role of eukaryotic subtilisin-like endoproteases for the activation of human immunodeficiency virus glycoproteins in natural host cells. *J. Virol.* **71**, 1036-1045.
- Hatsuzawa, K., Hosaka, M., Nakagawa, T., Nagase, M., Shoda, A., Murakami, K., and Nakayama, K.** (1990). Structure and expression of mouse furin, a yeast KEX2-related protease. *J. Biol. Chem.* **265**, 22075-22078.
- Hatsuzawa, K., Murakami, K., and Nakayama, K.** (1992). Molecular and enzymatic properties of furin, a KEX2-like endoprotease involved in precursor cleavage at arg-x-lys/arg-arg sites. *J. Biochem. (Tokyo)* **111**, 296-301.
- Hayflick, J. S., Wolfgang, W. J., Forte, M. A., and Thomas, G.** (1992). A unique Kex2-like endoprotease from *Drosophila melanogaster* is expressed in the central nervous system during early embryogenesis. *J. Neurosci.* **12**, 705-717.
- Hosaka, M., Nagahama, M., Kim, W., Watanabe, T., Hatsuzawa, K., Ikemizu, J., Murakami, K., Nakayama, K.** (1991). Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **266**, 12127-12130.
- Jones, B. G., Thomas, L., Molloy, S. S., Thulin, C. D., Fry, M. D., Walsh, K. A., and Thomas, G.** (1995). Intracellular trafficking of furin is modulated by the phosphorylation state of a casein kinase II site in its cytoplasmic tail. *EMBO J.* **14**, 5869-5883.
- Kennelly, P. J., and Krebs, E.** (1991). Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* **266**, 15555-15558.
- Kiefer, M. C., Tucker, J. E., Joh, R., Landsberg, K. E., Saltman, D., Barr, P. J.** (1991). Identification of a second human subtilisin-like protease gene in the fes/fps region of chromosome 15. *DNA Cell Biol.* **10**, 757-769.
- Kimpel, K. R., Molloy, S. S., Thomas, G., and Leppla, S. H.** (1992). Anthrax toxin protective antigen is activated by a cell surface protease with the sequence specificity and catalytic properties of furin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10277-10281.
- Khan, A. R., James, M. N.** (1998). Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Sci.* **7**, 815-836.
- Klenk, H.-D., and Garten, W.** (1994). Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends in Microbiol.* **2**, 39-42.
- Korner, J., Chun, J., O'Bryan, L., Axel, R.** (1991). Prohormone processing in *Xenopus* oocytes: characterization of cleavage signals and cleavage enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 11393-11397.

- Kyhse-Anderson, J.** (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **10**, 203-209.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Leduc, R., Molloy, S. S., Thorne, B. A., Thomas, G.** (1992). Activation of human furin precursor processing endoprotease occurs by an intramolecular autoproteolytic cleavage. *J. Biol. Chem.* **267**, 14304-14308.
- Luckow, V. A., Lee, S. C., Barry, G. F., Olins, P. O.** (1993). Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J. Virol.* **67**, 4566-4579.
- Lusson, J., Vieau, D., Hamelin, J., Day, R., Chretien, M., Seidah, N. G.** (1993). cDNA structure of the mouse and rat subtilisin/kexin-like PC5: a candidate proprotein convertase expressed in endocrine and nonendocrine cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 6691-6695.
- McPhalen, C. A., James, M. N.** (1988). Structural comparison of two serine proteinase-protein inhibitor complexes: eglin-c-subtilisin Carlsberg and CI-2-subtilisin Novo. *Biochemistry* **27**, 6582-6598.
- McPherson, A.** (1990). Current approaches to macromolecular crystallisation. *Eur. J. Biochem.* **189**, 1-23.
- Meerabux, J., Yaspo, M. L., Roebroek, A. J., Van de Ven, W. J., Lister, T. A., Young, B. D.** (1996). A new member of the proprotein convertase gene family (LPC) is located at a chromosome translocation breakpoint in lymphomas. *Cancer Res.* **56**, 448-451.
- Misumi, Y., Sohda, M., Ikehara, Y.** (1990). Sequence of the cDNA encoding rat furin, a possible propeptide-processing endoprotease. *Nucleic Acids Res.* **25**, 6719.
- Misumi, Y., Oda, K., Fujiwara, T., Takami, N., Tashiro, K., Ikehara, Y.** (1991). Functional expression of furin demonstrating its intracellular localization and endoprotease activity for processing of proalbumin and complement Pro-C3. *J. Biol. Chem.* **266**, 16954-16959.
- Moehring, J. M., Inocencio, N. M., Robertson, B. J., and Moehring, T. J.** (1993). Expression of mouse furin in a chinese hamster cell resistant to pseudomonas exotoxin A and viruses complements the genetic lesion. *J. Biol. Chem.* **268**, 2590-2594.

- Molloy, S. S., Bresnahan, P. A., Leppla, S. H., Kimpel, K. R., Thomas, G.** (1992). Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *J. Biol. Chem.* **267**, 16396-16402.
- Molloy, S. S., Thomas, L., Van Slyke, J. K., Stenberg, P. E., and Thomas, G.** (1994). Intracellular trafficking and activation of the furin proprotein convertase: Localization to the TGN and recycling from the cell surface. *EMBO J.* **13**, 18-33.
- Munzer, J. S., Basak, A., Zhong, M., Mamarbachi, A., Hamelin, J., Savaria, D., Lazure, C., Hendy, G. N., Benjannet, S., Chretien, M., Seidah, N. G.** (1997). *In vitro* characterization of the novel proprotein convertase PC7. *J. Biol. Chem.* **272**, 19672-19681. Erratum in: *J. Biol. Chem.* **272**, 30589.
- Nagle, G. T., Garcia, A. T., Gorham, E. L., Knock, S. L., Van Heumen, W. R., Spijker, S., Smit, A. B., Geraerts, W. P., and Kurosky, A.** (1995). Molecular cloning and cellular localization of a furin-like prohormone convertase from the atrial gland of *Aplysia*. *DNA Cell Biol.* **14**, 431-443.
- Nakagawa, T., Hosaka, M., Torii, S., Watanabe, T., Murakami, K., Nakayama, K.** (1993a). Identification and functional expression of a new member of the mammalian Kex2-like processing endoprotease family: its striking structural similarity to PACE4. *J. Biochem.* **113**, 132-135.
- Nakagawa, T., Murakami, K., Nakayama, K.** (1993b). Identification of an isoform with an extremely large Cys-rich region of PC6, a Kex2-like processing endoprotease. *FEBS Lett.* **327**, 165-171.
- Nakayama, K.** (1997). Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem. J.* **327**, 625-635.
- Oda, K., Misumi, Y., Ikehara, Y., Brennan, S. O., Hatsuzawa, K., Nakayama, K.** (1992). Proteolytic cleavages of proalbumin and complement Pro-C3 *in vitro* by a truncated soluble form of furin, a mammalian homologue of the yeast Kex2 protease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**, 1353-1361.
- Ortmann, D., Ohuchi, M., Angliker, H., Shaw, E., Garten, W., and Klenk, H.-D.** (1994). Proteolytic activation of wild type and mutants of the F-protein of human parainfluenza virus type 3 by two subtilisin-like endoproteases, furin and Kex2. *J. Virol.* **68**, 2772-2776.
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., Gray, T.** (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* **4**, 2411-2423.
- Plaimauer, B., Mohr, G., Wernhart, W., Himmelsbach, M., Dorner, F., Schlokot, U.** (2001). 'Shed' furin: mapping of the cleavage determinants and identification of its C-terminus. *Biochem. J.* **354**, 689-695.

- Richt, J. A., Furbringer, T., Koch, A., Pfeuffer, I., Herden, C., Bause-Niedrig, I., Garten, W.** (1998). Processing of the Borna disease virus glycoprotein gp94 by the subtilisin-like endoprotease furin. *J. Virol.* **72**, 4528-4533.
- Robertson, B. J., Moehring, J. M., Moehring, T. J.** (1993). Defective processing of the insulin receptor in an endoprotease-deficient chinese hamster cell strain is corrected by expression of mouse furin. *J. Biol. Chem.* **268**, 24272-24277.
- Roebroek, A. J. M., Schalken, J. A., Leunissen, J. A. M., Onnekink, C., Bloemers, H. P. J., Van de Ven, W. J. M.** (1986). Evolutionary conserved close linkage of the c-fes/fps proto-oncogene and genetic sequences encoding a receptor-like protein. *EMBO J.* **5**, 2197-2202.
- Roebroek, A. J. M., Pauli, I. G. L., Zhang, Y., and Van de Ven, W. J. M.** (1991). cDNA sequence of a *Drosophila melanogaster* gene, Dfur1, encoding a protein structurally related to the subtilisin-like processing enzyme furin. *FEBS Lett.* **289**, 133-137.
- Roebroek, A. J. M., Creemers, J. W. M., Pauli, I. G. L., Kurzik-Dumke, U., Rentrop, M., Gateff, E. A. F., Leunissen, J. A. M., Van de Ven, W. J. M.** (1992). Cloning and functional expression of Dfurin2, a subtilisin-like proprotein processing enzyme of *Drosophila melanogaster* with multiple repeats of a cysteine motif. *J. Biol. Chem.* **267**, 17208-17215.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Schäfer, W., Stroh, A., Berghöfer, S., Seiler, J., Vey, M., Kruse, M.-L., Kern, H. F., Klenk, H.-D., Garten, W.** (1995). Two independent targeting signals in the cytoplasmic domain determine *trans*-Golgi network localization and endosomal trafficking of the proprotein convertase furin. *EMBO J.* **14**, 2424-2435.
- Schechter, I., Berger, A.** (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**, 157-162.
- Seidah, N. G., Gaspar, L., Mion, P., Marcinkiewicz, M., Mbikay, M., Chretien, M.** (1990). cDNA sequence of two distinct pituitary proteins homologous to Kex2 and furin gene products: tissue-specific mRNAs encoding candidates for pro-hormone processing proteinases. *DNA Cell. Biol.* **9**, 415-424. Erratum in: *DNA Cell. Biol.* **9**, 789.
- Siezen, R. J., Creemers, J. W. M., and Van de Ven, W. J. M.** (1994). Homology modelling of the catalytic domain of human furin. A model for the eukaryotic subtilisin-like proprotein convertases. *Eur. J. Biochem.* **222**, 255-266.
- Siezen, R. J., Leunissen, J. A. M.** (1997). Subtilases: The superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Science* **6**, 501-523.

- Smeekens, S. P., Avruch, A. S., La Mendola, J., Chan, S. J., Steiner, D. F.** (1991). Identification of a cDNA encoding a second putative prohormone convertase related to PC2 in AtT20 cells and islets of Langerhans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 340-344.
- Smit, A. B., Spijker, S., Nagle, G. T., Knock, S. L., Kurosky, A., and Geraerts, W. P.** (1994). Structural characterization of Lymnaea putative endoprotease related to human furin. *FEBS Lett.* **343**, 27-31.
- Spence, M. J., Sucic, J. F., Foley, B. T., Moehring, T. J.** (1995). Analysis of mutations in alleles of the *fur* gene from an endoprotease-deficient Chinese hamster ovary cell strain. *Somat. Cell Mol. Genet.* **21**, 1-18.
- Steiner, D. F.** (1998). The proprotein convertases. *Curr. Op. Chem. Biol.* **2**, 31-39.
- Stieneke-Gröber, A., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E., Thomas, G., Roberts, C., Klenk, H.-D., Garten, W.** (1992). Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO J.* **11**, 2407-2414.
- Stroh, A., Schäfer, W., Berghöfer, S., Eickmann, M., Teuchert, M., Bürger, I., Klenk, H.-D., Garten, W.** (1999). A mono phenylalanine-based motif (F790) and a leucine-dependent motif (LI760) mediate internalization of furin. *Eur. J. Cell. Biol.* **78**, 151-160.
- Tangrea, M. A., Alexander, P., Bryan, P. N., Eisenstein, E., Toedt, J., Orban, J.** (2001). Stability and global fold of the mouse prohormone convertase 1 pro-domain. *Biochemistry* **40**, 5488-5495.
- Teuchert, M., Schäfer, W., Berghöfer, S., Hoflack, B., Klenk, H.-D., Garten, W.** (1999a). Sorting of furin at the *trans*-Golgi network. Interaction of the cytoplasmic tail sorting signals with AP-1 Golgi-specific assembly proteins. *J. Biol. Chem.* **274**, 8199-8207.
- Teuchert, M., Berghöfer, S., Klenk, H.-D., Garten, W.** (1999b). Recycling of furin from the plasma membrane. Functional importance of the cytoplasmic tail sorting signals and interaction with the AP-2 adaptor medium chain subunit. *J. Biol. Chem.* **274**, 36781-36789.
- Thomas, G., Thorne, B. A., Thomas, L., Allen, R. G., Hruby, D. E., Fuller, R., Thorner, J.** (1988). Yeast KEX2 endoprotease correctly cleaves a neuroendocrine prohormone in mammalian cells. *Science* **241**, 226-230.
- Tsuneoka, M. K., Nakayama, K., Hatsuzawa, M., Komada, M., Kitamura, N., and Mekada, E.** (1993). Evidence for involvement of furin in cleavage and activation of diphtheria toxin. *J. Biol. Chem.* **268**, 26461-26465.

- Van den Ouweland, A. M., Van Duijnhoven, H. L., Keizer, G. D., Dorssers, L. C., Van de Ven, W. J.** (1990). Structural homology between the human *fur* gene product and the subtilisin-like protease encoded by yeast KEX2. *Nucleic Acids Res.* **18**, 664. Erratum in: *Nucleic Acids Res.* **18**, 1332.
- Van de Ven, W. J., Voorberg, J., Fontijn, R., Pannekoek, H., van den Ouweland, A. M., van Duijnhoven, H. L., Roebroek, A. J., Siezen, R. J.** (1990). Furin is a subtilisin-like proprotein processing enzyme in higher eukaryotes. *Mol. Biol. Rep.* **14**, 265-275.
- Vey, M., Orlich, M., Adler, S., Klenk, H.-D., Rott, R., Garten, W.** (1992). Hemagglutinin activation of pathogenic avian influenza viruses of serotype H7 requires the protease recognition motif R-X-K/R-R. *Virology* **188**, 408-413.
- Vey, M., Schäfer, W., Berghöfer, S., Klenk, H.-D., Garten, W.** (1994). Maturation of the *trans*-Golgi network protease furin: compartmentalization of propeptide removal, substrate cleavage, and COOH-terminal truncation. *J. Cell. Biol.* **127**, 1829-1842.
- Vey, M., Schäfer, W., Reis, B., Ohuchi, R., Britt, W., Garten, W., Klenk, H.-D., Radsak, K.** (1995). Proteolytic processing of human cytomegalovirus glycoprotein B(gpUL55) is mediated by the human endoprotease furin. *Virology* **206**, 746-749.
- Vogelstein, B., and Gillespie, D.** (1979). Preparative and analytical purification of DNA from Agarose. *Proc. Natl. Acad. Natl. Sci. USA* **76**, 615-619.
- Volchkov, V. E., Feldmann, H., Volchkova, V. A., Klenk, H.-D.** (1998). Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 5762-5767.
- Volchkov, V. E., Volchkova, V. A., Ströher, U., Becker, S., Dolnik, O., Cieplik, M., Garten, W., Klenk, H.-D., Feldmann, H.** (2000). Proteolytic processing of Marburg virus glycoprotein. *Virology* **268**, 1-6.
- Voorhees, P., Deignan, E., van Donselaar, E., Humphrey, J., Marks, M. S., Peters, P. J., and Bonifacino, J. S.** (1995). An acidic sequence within the cytoplasmic domain of furin functions as a determinant of *trans*-Golgi network localization and internalization from cell surface. *EMBO J.* **14**, 4961-4975.
- Walker, P. A., Leong, L. E., Ng, P. W., Tan, S. H., Waller, S., Murphy, D., Porter, A. G.** (1994). Efficient and rapid affinity purification of proteins using recombinant fusion proteases. *Biotechnology (N.Y.)* **12**, 601-605.
- Wasley, L. C., Rehemtulla, A., Bristol, J. A., Kaufman, R. J.** (1993). PACE/furin can process the vitamin K-dependent pro-factor IX precursor within the secretory pathway. *J. Biol. Chem.* **268**, 8458-8465.
- Watanabe, T., Murakami, K., Nakayama, K.** (1993). Positional and additive effects of basic amino acids on processing of precursor proteins within the constitutive secretory pathway. *FEBS Lett.* **320**, 215-218.



- Watanabe, M., Hirano, A., Stenglein, S., Nelson, J., Thomas, G., Wong, T. C.** (1995). Engineered serine protease inhibitor prevents furin-catalyzed activation of the fusion glycoprotein and production of infectious measles virus. *J. Virol.* **69**, 3206-3210.
- Wise, R. J., Barr, P. J., Wong, P. A., Kiefer, M. C., Brake, A. J., Kaufman, R. J.** (1990). Expression of human proprotein processing enzyme: correct cleavage of the von Willebrand factor precursor at a paired basic amino acid site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9378-9382.
- Zhong, M., Munzer, J. S., Basak, A., Benjannet, S., Mowla, S. J., Decroly, E., Chretien, M., Seidah, N. G.** (1999). The prosegments of furin and PC7 as potent inhibitors of proprotein convertases. *In vitro* and *ex vivo* assessment of their efficacy and selectivity. *J. Biol. Chem.* **274**, 33913-33920.
- Zhu, Y. S., Zhang, X. Y., Cartwright, C. P., Tipper, D. J.** (1992). Kex2-dependent processing of yeast K1 killer preprotoxin includes cleavage at ProArg-44. *Mol. Microbiol.* **6**, 511-20.

## Lehrbücher

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D.** (1995). Molekularbiologie der Zelle. 3. Auflage, *VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim*.
- Atkins, Peter W.** (1990). Physikalische Chemie. 2. korrigierter Nachdruck der 1. Auflage 1987, *VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim*.
- Böhm, H.-J., Klebe, G., Kubinyi, H.** (1996). Wirkstoffdesign. *Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin*.
- Creighton, T. E.** (1997). Protein Structure. A practical Approach. 2<sup>nd</sup> Ed. *Oxford University Press, Oxford*.
- Dixon, M., Webb, E. C.** (1967). Enzymes. *Longmans Green, and Co. Ltd., London*.
- Ducruix, A., and Giegé, R.** (1992). Crystallization of Nucleic Acids and Proteins. A practical Approach. *Oxford University Press, Oxford*.
- Lesk, Arthur M.** (2001). Introduction to Protein Architecture. *Oxford University Press, Oxford*.
- Lottspeich, F., Zorbas, H.** (1998). Bioanalytik. *Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin*.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J.** (1982). Molecular Cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory, New York*.
- Modrow, S., Falke, D.** (1997). Molekulare Virologie. *Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin*.
- Otto, M.** (1995). Analytische Chemie. *VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim*.
- Voet, D., Voet, J. G.** (1992). Biochemie. *VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim*.

## Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AA	Aminosäuren
Abz	2-Aminobenzoyl-Rest
Ac	Acetyl
AMC	7-Amido-4-methylcumarin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARF	ADP ribosylation factor
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ASU	Ammoniumsulfat
bp	Basenpaare
Boc	<i>tert</i> -Butoxycarbonyl ( <i>1,1</i> -Dimethylethoxycarbonyl)
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin
c	Konzentration
°C	Grad-Celsius
cDNA	complementary DNA
CGN	<i>cis</i> -Golgi-Netzwerk
cmk	Chloromethylketon
C-terminal	Carboxy-terminal
Da	Dalton
dec	decanoyl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EU	Emission Units
FPLC	Fast-Protein Liquid Chromatography
fur	fes/fps upstream region
G	Guanin
g	Gramm; Fallbeschleunigung
gB	Glykoprotein B ( <i>HCMV</i> )
gp	Glykoprotein
GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HCMV	humanes Cytomegalievirus
HIC	hydrophobic interaction chromatography
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
HRV	humanes Rhinovirus V

---

Hz	Hertz
IC <sub>50</sub>	halbmaximale Hemmkonzentration
IEX	ion exchange chromatography
IMAC	immobilisierte Metallchelate Affinitätschromatographie
IPTG	1-Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasenpaar
l	Liter
lac	Lactose
Lambda: $\lambda$	Wellenlänge
LB-Medium	Luria Bertani-Medium
m	Meter
mAU	milli Absorption Units
MBP	Maltosebindungsprotein
MCS	Multiple Cloning Site
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure-Monohydrat
min	Minute
M.O.I.	multiplicity of infection
mS	milli Siemens
MW <sub>calc.</sub>	calculated molecular weight
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NC	Nitrocellulose
NMR	nuclear magnetic resonance
N-terminal	Amino-terminal
OD	optische Dichte
PACE	paired basic-aminoacid cleaving enzyme
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PC	Protein-Convertase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PFU	Plaque forming Units
ppm	parts per million
rER	rauhes Endoplasmatisches Retikulum
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SEC	size exclusion chromatography
SPC	subtilisin-like proprotein convertase
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
tac	Tryptophan- / Lactose-
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TGN	<i>trans</i> -Golgi-Netzwerk
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	transformation and storage solution
U	unit
ü. N.	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur

---

UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VIS	sichtbarer Spektralbereich

### Abkürzungen der verwendeten Größenordnungen

M	Mega	$10^6$
k	Kilo	$10^3$
d	Dezi	$10^{-1}$
c	Zenti	$10^{-2}$
m	Milli	$10^{-3}$
$\mu$	Mikro	$10^{-6}$
n	Nano	$10^{-9}$
p	Pico	$10^{-12}$

### Ein- und Dreibuchstaben-Code für Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
B	Asx	Asparagin / Asparaginsäure	N	Asn	Asparagin
C	Cys	Cystein	P	Pro	Prolin
D	Asp	Asparaginsäure	Q	Gln	Glutamin
E	Glu	Glutaminsäure	R	Arg	Arginin
F	Phe	Phenylalanin	S	Ser	Serin
G	Gly	Glycin	T	Thr	Threonin
H	His	Histidin	V	Val	Valin
I	Ile	Isoleucin	W	Trp	Tryptophan
K	Lys	Lysin	Y	Tyr	Tyrosin
L	Leu	Leucin	Z	Glx	Glutamin / Glutaminsäure

---

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abb. 1: Schematische Darstellung eines umhüllten Virus.
- Abb. 2: Übersicht und Aufbau der eukaryontischen subtilisinähnlichen Endoproteasen SPC1 bis SPC7 im Vergleich zu Subtilisin BPN' (*Bacillus Protease N' aus *Bacillus amyloliquefaciens*) und Kexin (aus *Saccharomyces cerevisiae*).*
- Abb. 3: Schematischer Aufbau von SFurin.
- Abb. 4: Schematische Darstellung des Vektors pCR 2.1.
- Abb. 5: Schematische Darstellung des prokaryontischen Expressionsvektors pMAL-c2.
- Abb. 6: Schematische Darstellung des eukaryontischen Expressionsvektors pFASTBAC1.
- Abb. 7: Das Schema zeigt die Spaltung des Substrats Abz-RVKRGLAY(NO<sub>2</sub>)D-OH durch Furin.
- Abb. 8: Schematische Darstellung dreier Mikrotechniken zur Kristallisation von Proteinen.
- Abb. 9: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie des SFurin Konstrukts in pFASTBAC1.
- Abb. 10: Schematische Darstellung des rekombinanten SFurins.
- Abb. 11: Vergleich der SFurin-Aktivität in Zellkulturüberständen von Baculo-SFur Virus infizierten Sf9-Zellen mit High-Five™-Zellen.
- Abb. 12: Fließdiagramm der Reinigung von rekombinanten SFurin.
- Abb. 13: Chromatographie-Bedingungen und Elutionsprofil der Entsalzung von SFurin des resuspendierten Pellets nach 45 % Ammoniumsulfatfällung.
- Abb. 14: Chromatographie-Bedingungen und Elutionsprofil der Anionenaustauschchromatographie von SFurin der 45 % Ammoniumsulfatfällung nach HiPrep 26/10 Desalting.
- Abb. 15: Das Diagramm zeigt die Anreicherungsfaktoren der Fraktionen 4 bis 12 nach Anionenaustauschchromatographie und Entsalzen mittels NAP-5 Säulen.
- Abb. 16: Chromatographie-Bedingungen und Elutionsprofil der Ausschlußchromatographie von SFurin der Fraktion 7 nach Ionenaustauschchromatographie.
- Abb. 17: Das Diagramm zeigt die Anreicherungsfaktoren der Fraktionen 6 bis 16 nach Ausschlußchromatographie.
- Abb. 18: SDS-PAGE der Fraktionen 10 – 13 und Western Blot von Fraktion 11 nach Superdex-75.
- Abb. 19: Enzymkinetik der Spaltung von Abz-RVKRGLAY(NO<sub>2</sub>)D-OH mittels SFurin.
- Abb. 20: Michaelis-Menten-Kinetik.
- Abb. 21: Lineweaver-Burk-Plot:
- Abb. 22: Thermostabilitäts-Profil von SFurin.
- Abb. 23: Aminosäuresequenz der bakteriell exprimierten Prodomäne von SFurin.
- Abb. 24: SDS-PAGE verschiedener Stufen der bakteriellen Expression der SFurin Prodomäne.
- Abb. 25: Elutionsprofil der Kationenaustauschchromatographie der SFurin Prodomäne nach Faktor Xa Spaltung.
- Abb. 26: SDS-PAGE der Fraktionen 3-7, 12-14 und 22 nach Mono S HR 5/5.
- Abb. 27: Zwei verschiedene Kristallformen der Prodomäne von SFurin: A) Nadeln und B) kompakte Einkristalle.

Abb. 28: Darstellung der kovalenten Bindung von Chloromethylketonen am Beispiel von Dec-RVVR-cmk im katalytischen Zentrum von Serinproteasen.

Abb. 29: Dixon-Plot von Inhibitor A.

Abb. 30: Dixon-Plot von Inhibitor B.

Abb. 31: Dixon-Plot von Inhibitor C.

Abb. 32: Dixon-Plot von Inhibitor D.

Abb. 33: Dixon-Plot von Inhibitor E.

Abb. 34: Dixon-Plot von Inhibitor F.

Abb. 35: Dixon-Plot von Inhibitor G.

Abb. 36: Dixon-Plot von Inhibitor H.

Abb. 37: Dixon-Plot von Inhibitor I.

Abb. 38: Dixon-Plot von Inhibitor J.

Abb. 39: Dixon-Plot von Inhibitor K.

Abb. 40: Dixon-Plot der bakteriell exprimierten Prodomäne von SFurin.

Abb. 41: Dreidimensionales Bändermodell der katalytischen Domäne von humanen Furin.

Abb. 42: Schematische Darstellung eines Substrats/Inhibitors (*fette Linie*), gebunden an die Substrat-bindestelle von humanen Furin (*gewölbte Oberfläche*).

Abb. 43: Vergleich der Aminosäuresequenz der Prodomäne von humanem Furin (*HFurin*) und *Spodoptera frugiperda* Furin (*SFurin*).

Abb. 44: Schematische Darstellung der Faltung der Subtilisin Prodomäne.

Tab. 1: Übersicht der aus verschiedenen Organismen isolierten Formen von Furin.

Tab. 2: Inhibitorprofil für SFurin und BFurin.

Tab. 3: Vergleich der Volumina nach Resuspension, Proteinkonzentration, Proteinmenge und SFurin-Enzymaktivität nach fraktionierter Ammoniumsulfatfällung.

Tab. 4: Anzahl der chromatographischen Trennungen zur Entsalzung und Volumina der vereinten Fraktionen.

Tab. 5: Übersicht der getesteten Peptid-Inhibitoren.

Tab. 6: Übersicht der mittels Dixon-Plot bestimmten Hemmkonstanten der verschiedenen Peptid-Inhibitoren einschließlich der SFurin-Prodomäne.

Tab. 7: Vergleich der Hemmkonstanten der getesteten kompetitiven Inhibitoren, zu denen auch die SFurin-Prodomäne zählt (5.3.4), mit denen aus der Literatur (Zitate siehe Text).

Inhibitor	Konzentration [ $\mu\text{M}$ ]	Verbleibende Furinaktivität [%]	
		SFurin	BFurin
Aprotinin	10	100	99
Leupeptin	10	100	94
Pepstatin A	10	100	100
APMSF	100	100	100
AEBSF	100	90	94
Phosphoramidon	100	98	100
Bestatin	100	98	100
PMSF	600	100	95
Antipain Dihydrochlorid	100	96	96
Chymostatin	3	100	100
	8	50	48
	16	0	0
Iodacetamid	1200	65	58
E-64	300	88	84
DTT	1000	100	100
	2000	72	76
1,10-Phenanthrolin	1000	71	76
EDTA	8	51	44
	15	0	0
EGTA	8	42	38
	15	0	0
ZnCl <sub>2</sub>	15	0	0
HgCl <sub>2</sub>	15	0	0
CuSO <sub>4</sub>	15	0	0
MgCl <sub>2</sub>	1000	95	91
FeSO <sub>4</sub>	1000	70	63
MnCl <sub>2</sub>	1000	53	55

**Tab. 2: Inhibitorprofil für SFurin und BFurin.** Die Hemmstudien wurden anhand der löslichen Formen von SFurin bzw. BFurin durchgeführt (Cieplik et al., 1998). Dazu wurde der Zellkulturüberstand von Sf9-Zellen nach Infektion mit rekombinanten Baculoviren eingesetzt. Diese Überstände wurden mit den aufgelisteten Substanzen vorinkubiert und anschließend die verbleibende Furin-Aktivität mit einem *in vitro* Enzym-Fluoreszenztest (*Substrat: RTKR-AMC*) gemessen (EINLEITUNG, 1.3.4).



***Spodoptera frugiperda* Furin Aminosäure-Sequenz**

1.....10.....20.....30.....40.....50	
MVTSWRALALLAALHACAA <b>LPEPVYHDQFAVHV</b> PAGPHVDDIARRHGFV	50
<b>NHGQIGSLKNYYLLSHHEVRKRSTEP</b> SHEHHKKLNDEPQVRWFEQ <b>QREKR</b>	100
<b>RIKR</b> DYSPYDRASFSQLSRRLQPHRTNYRALTSSPFFPDPLFKEQWYLN <b>G</b>	150
GAKDGLDMNVAPAWQKGYTGKGVVVSILD <b>D</b> GIQTNHPDLAQNYDP <b>NAS</b> TD	200
INGNDEDMPQDNGDNK <b>H</b> GTRCAGEVAAYNQYCGVGIA <b>YNAS</b> IGGV <b>RM</b>	250
LDGVVNDAVEARALGLNPDHIDIYSASWGPEDDGKTVDGPGPLARRAFI <b>Y</b>	300
GVTSGRRGKGSIFVWAS <b>G</b> NGGRHTDSCNCDGYTNSIFTLSISSATQGGY <b>K</b>	350
PWYLEECSTLATTYSSGTPGHDKSVATVMDGRLRSDHICTVEHTGT <b>SA</b>	400
SAPLAAGICALALEANPELTWRDMQYLVVMTSR <b>PQPLEKEGGWI</b> INGV <b>KR</b>	450
<b>KVSHKFGYGLMDASEMVSLAEQWVSVP</b> PHICK <b>SQ</b> EINEDKQ <b>IE</b> STFGY <b>T</b>	500
<b>LSAHMDVNGCSSTVNEVRYLEHVQCKISLRFF</b> PRGNLRILLTSPMGTV <b>ST</b>	550
<b>LLFERPRD</b> VSSNFDDWPF <b>LSVHF</b> WGEHA <b>EGRWTLQIVN</b> AGNRHV <b>NQAGI</b>	600
<b>LKKWQLIFYGTSVDPVRLR</b> <b>TKR</b> PSVPAPFFA <b>FTAADGYETIGDSFYNTD</b>	650
<b>AFANYQNFPNLFAAGSDPEKAVARLDGHN</b> VPSPHGENVLAD <b>SNDKRMHD</b>	700
CDPECDSQGCYKGKPTQCIACKHYRLDDSCVSRCPPRS <b>YANQGGVCWPCH</b>	750
ESCETCVGPGQDSCLTCAPAHLLVADLAVCLQQCPDGYWEDSEASVCR <b>PC</b>	800
AAHCATC <b>SERADGCT</b> SCEHHLVLHDGTCMASCPPSHYETEDDMCAK <b>CHES</b>	850
CDTCQGPGETQCVTCHPSTYALDGRCVTSCPPAYYADKKRKECMRCPV <b>GC</b>	900
STCTSAFCL <b>SCEPKWELN</b> KKGKMPVGSDKCSAGEFAVDQKCKRCNPACD	950
SCYGENEGHCLTCPNPNLLQDYKCVPECSKGYAAEAGRCARCMHGCSDCV	1000
SRL <b>NCT</b> SCASTLRLQSGACRTSCADGYADRGTC <b>SKCYL</b> SCRTCIGPRRD	1050
QCASCPEGWRLAAGECHPECPQGFYQSPGGCRHCHHYCRECDGSGPLH <b>CK</b>	1100
SCPPRFMLDGGLCMECLGSQYYDATSGTCRSCDASCRTCSGPGQFSC <b>TT</b>	1150
<b>SRPLR</b> IDRLNNQCVPCCSERGVNTSTPPTDCCHCNPENGE <b>CINSS</b> VAGKR	1200
RIAEWGALHTAPSAD <b>AAPSVAVVTIAVCAA</b> AVGLFITVLVVLQ <b>AHSPREK</b>	1250
KTRKTSVRGVEYSRLPRTDVDFTVLTSCTDQEGPVEYEHEP <b>LL</b> KDSTST	1299

AA-Position	1 - 19	Signalpeptid	
AA-Position	20 - 104	Prodomäne	(kursivgedruckt)
AA-Position	105 - 433	Katalytische Domäne	
AA-Position	434 - 700	Mitteldomäne	(fettgedruckt)
AA-Position	701 -1215	Cysteinreiche Domäne	
AA-Position	1216 -1242	Membrandomäne	(fettgedruckt)
AA-Position	1243 -1299	Cytoplasmatische Domäne	

**XXX:** potentielle N-Glykosylierungsstelle  
**X:** katalytische Aminosäure  
**XXXX:** mehrbasische Furin-Spaltsequenz  
**XXXXX:** Transport-/ Lokalisationssignale

***Spodoptera frugiperda* Furin cDNA Basensequenz**

- **Start-Codon:** atg (448)
- **Stopp-Codon:** tga (4347)
- Matrize pBluescript SK/sfur 93-6385 (*Klon 5*): aac (93); atc (6385)
- Prodomäne: Start ctc (505); Ende agg (759)
- Ende der Mitteldomäne: gac (2547)

```

1 attctgtcaa agtaggtagc tgtttacgtt tttctatcgt tattttgcca tcgttttgca
61 caacttttgt tatatcttat tgtttttatg ataacgcttt atccctacgt cttactggtg 93
121 aaaatataaa agtgatatatt cttacgttta atgaacaatg tcagatgtca agagggtgaat
181 agtctgtggt ttgtgttcta acgtgtgagt gacagttttt atattgtttg ggatttggag
241 cgataaacat atcgggtataa cgagggtgga tgacacagtg ttcgactagg tcaacactga
301 agacgttcgg gaaatattag taggtgtggt tgataaaagt gcgtgggagt tccttatgac
361 aaggactgag tagttggaac gcgcggttgt tattgtgtcg gtgggttgca gatgcggttg
421 tgatttgtga gtgtagtggg tactgtcatg gtgacatcat ggcgcgcgct ggcgctgctg 448
481 gcggcgctgc acgcgtgcgc cgcgctcccg gagccggtgt accacgacca gttcgcggtg 505
541 cagtgccctg caggcccgca ccacgtcgat gacatcgcca gaaggcacgg ctttgtcaat
601 catggacaga ttggttcgct gaagaactac tacttgctgt cacatcatga agtccgcaaa
661 cgatccacgg agccgagtca cgaacaccat aaaaaattaa atgacgaacc acaagttaga
721 tggttcgaac agcaaaggga aaagcggcgt ataaagagg actattcccc gtacgatcgc 759
781 gcatcgttct cgcaactgtc tcgcgggttg caaccccatc gcaccaacta tcgggcgctc
841 acctcttcac cattctttcc tgacctctc ttcaaggaac aatggtactt gaacggcggt
901 gccaaaggat gtctggatat gaacgtggcc cccgcttggt agaagggcta tacagggaag
961 ggagtcgtcg tctccattct ggacgacggc atacagacca accatccgga tttygcacag
1021 aactatgata ccaacgcgtc tactgacatc aatggcaatg atgaggatcc tatgccacaa
1081 gacaacggtg acaacaagca cggcacgcga tgtgctggcg aggttgccgc agttgcctac
1141 aatcagtagt gcggtgtagg cattgcctac aacgcgagta ttggtggtgt aaggatgttg
1201 gacggtgtcg tcaatgatgc cgttgaagcc agagctttag gtctcaacc agaccacatc
1261 gatatttaca gcgcttcctg gggaccagaa gatgatggaa aaaccggtga cgggccagga
1321 ccacttgcca gaagagcctt catctacgga gtcactagtg gtcgtcgcgg taaagggtcc
1381 atatttgtat gggcatcagg aaacggtgga agacatacag actcttgtaa ttgtgacggc
1441 tatacgaaca gtatatattac gttatctatt tctagtgtca ctcaagggtg ttataaacct
1501 tggtagctag aagagtgtc tctactaccta gctactacgt acagctcggg taccocggga
1561 ccgataaaga gtgtcgccac cgttgacatg gacggcagg taagatccga ccacatctgt
1621 acagtagaac atacaggtac ctgcgcctcc gctccccttg cggctggtat ttgtgcttta
1681 gctctagaag caaacctga actcacatgg agagatatgc aatatttagt tgtaatgacg
1741 tctcgacctc aacctcttga gaaagaagga ggttggatca taaacggagt caagaggaaa
1801 gtaagtcaca aattcgggta cggctctatg gatgcttctg aaatggtcag ttttagcagaa
1861 caatgggtgt ccgtacctcc tcaacatatt tgtaagtcac aagaaattaa cgaagataag
1921 cagatagaat cgacatttgg ttacacccta tctgcgcata tggacgttaa tgggtgcagt NdeI
1981 tctacagtta atgaagtgcg ttatcttgaa catgttcaat gtaaaatatc attaaaggtt
2041 ttccctagag gtaatctacg tatactttta acatctccaa tgggtactgt gtcaacattg
2101 ctgtttgaaa ggccacgtga tgttgtagt tctaactttg atgattggcc cttcttaagt
2161 gttcacttct ggggtgaaca tgctgaaggt agatggacgc tacaaatagt aaatgctggc
2221 aacaggcatg taaaccaagc tggcatactt aaaaagtggc aacttatatt ctatggaaca
2281 tcagttgacc cagtacgatt aagaacaaaa aggcgcgcgc cagtagcgcc gccttttgct
2341 ttccccaccg ccgcagacgg ctatgaaact atcggggatt ctttttacia cactgacgcg
2401 tttgccaact atcaaaactt tccaaatcta ttcgcgcgcg ggtcagaccc ggaaaaggcg
2461 gtagctcgcc tcgatggaca taacgtccct tctccgcgat gggagaatgt cctcgctgat
2521 agtaatgaca agcgcgtcat gcatgactgt gatcccgaat gcgattctca aggatgctat 2547
2581 ggaaaaggac ctactcaatg tattgcgtgc aagcactatc gtctggacga ctcttgtgtt
2641 tctcgttgcc ctccaagaag ttacgctaac caaggtggag tgtgctggcc gtgtcacgag
2701 tcgtgcgaga cttgcgtggg accggggcag gactcgtgct taacttggtc ccagcacac
2761 ctactagttag cagaccttgc tgtctgcttg caacaatgtc cggacggata ctgggaagac
2821 agtgaggctt ccgtttgccc accatgtgcg gctcactgtg ccacttggtc cgagcgagct
2881 gatggttgca cgtcttgtga acaccatctc gtgcttcatg atggaacgtg catggcatcg
2941 tgccccccct ctactatga gactgaagat gatatgtgcg caaatgtca cgaatcctgt
3001 gacacttgcc aagggcccg ggaaacgcag tgcgtgacct gtcacccgtc gacttatgca
3061 ttagacgggc gatgtgttac gtcatgtcct ccagcgtatt acgccgacaa aaagaggaaa
3121 gagtgtatga gatgtcccg tggttgctca acctgcacga gtgcgttttg cctctcgtgt

```

3181 gaaccgaaat ggggaacttaa caaaaaagga aaatgtatgc ctgtgggtag cgacaaatgc  
 3241 agtgcagggtg aattttgcagt agatcagaaa tgtaagagat gtaacccggc ttgcgactcg  
 3301 tgctacgggtg aaaatgaagg acattgcctc acgtgtccga atccaaactt actacaggat  
 3361 taaaaatgtg taccagaatg cagtaaagggt tactacgccg aggtgtgtcg ctgtgcacgg  
 3421 tgcatgcacg ggtgtctcga ctgtgtgtcg cgactgaact gtacttcgtg cgccagcact  
 3481 ctgcgattgc agtccggagc ctgcaggact tcttgtgctg atgggtacta cgcggaccgc  
 3541 ggcacgtgtt caaagtgcga cctgtcgtgt cgcacttgta ttggggccgag acgagaccag  
 3601 tgcgcttcgt gtccctgaggg atggcggtcg gccgctggag agtgtcatcc ggagtgtcca  
 3661 caaggtttct accaaagccc aggcgggttg cgccactgcc accattactg ccgcgagtgt  
 3721 gacggctccg gtccgctcca ctgcaagtcg tgtccgcccc gcttcagtgt ggacggtggg  
 3781 ctgtgcatgg agtgcctcgg ctctcagtag tatgacgcga ccagcggcac gtgccgcagc  
 3841 tgtgacgcga gttgtcgaac gtgtctccga cccggtcagt tcagctgtac cacgtgctct  
 3901 aggcgctga gaattgacag gttaaacaat caatgcgtgc catgctgttc agaacgcggt  
 3961 gtcaccaatt ccacgccacc gacagactgt tgccattgta atcctgagaa cggcgagtgc  
 4021 ataaactcgt cgggtggcagg caagcgccgt atcgccgaat ggggcgcgtt gcacaccgcg  
 4081 ccgagcgtg cgcgcgcgcc cagtgtggcc gtggtgacga tcgcggtgtg cgcggcgggc  
 4141 gtcggcctgt tcattacagt actggtcgtg ttacaggcgc atagtcctcg cgagaagaag  
 4201 acgaggaaga cgagtgtgcg cggcgctcag tactcccggc tgccacgcac agacgttgac  
 4261 ttcaccgtgc tgacgtcgtg cacggaccag gagggaccgc tcgagtacga gcacgaacca  
 4321 ctctcaaaag attccacatc cacataggcg gcgctgtgat cctagaagta agtttatgac 4347  
 4381 gtatcgtttt atcatctgt cctttaccat gagttcacaa tacaaaatgc aattttgtca  
 4441 ctacttaaat agtaattttg tatgacaaag tttacagcgc ctctagcggg cacttatgga  
 4501 actaaaattt ggcatacaaa ataaatgtct tcgttaccga gcgtcgacaa atactattgc  
 4561 tttaatccca aggtagaggt acagagtcaa gtgaaccgc cagcagcgta ggtaagtcaa  
 4621 taagtgatgt acggtcacaa ctctcagtt attgaaatct ttagttgttc taattatccc  
 4681 atagagacat aagcagtaag tcaacttcgc tagtttatcc cagtttaaag ccgattcgat  
 4741 acaagttgaa ctattgttca tttctttatt gtgtttttaa ggaggaccag ttattaatat  
 4801 ttgtgttgaa tgttgttaga ccttttttaa aggtttgtg aaagccaacg aaacatgtaa  
 4861 agcgtgtagt gtacagcgcg gactttttat cgacatagtc aatacgatgt agttacttct  
 4921 gttatagtta atttattttac tcgactatct tctatcgatc gataaaatgt ccgtacttac  
 4981 cttgccttat gacacaagtt tacagaatat atcgtgactt tagcttacag tgtgtgctaa  
 5041 atatttgggt aaggtgtctg ctttgtaaac gcaggcatct gctctccaat gaacgccagt  
 5101 actcgaccat aataccgaca aaggatgttc cgagtagatc aatttatcga aacaaatacg  
 5161 tagctattta ttatgacgta acaaatggac tatttttaacg aaagctctgc ttgacgtgtt  
 5221 ctctcttata aaagaaaata taacaccaat actagtaata agaaatgaat tcgaaatttg  
 5281 tccgtattat gtcgaaccac aatcgaagta ctaaagtctc gtattttataa ataactatgt  
 5341 atgtatgtaa tatagctagt tataaaattg taagttgaac aaagaagttc gtgtagcgat  
 5401 ggttttcgac ccacacattg tgatacttgg acgatgtaat gtcaaagtgt tccttcaaca  
 5461 ttaactcgga ggtttgctaa cgtgacgttt tgcatgagcg atctagacgc gaacgcgatg  
 5521 cggtagcgcg cgacgcgaaa ttacaaactg ccacaatcta ttgccgtggc gtttaattcta  
 5581 tcaattagct tgatattttc gtgcgaactg gacgcgggtg cgctcatgtt ttgtttataa  
 5641 tgttgaaaac agaaaacaaa caaactgatt cacatgcacg tagggacata tcgcatcgcg  
 5701 ttggaatttc cgtatcccg caccgcttcg tgttcgcttc tagattgctc acacaggacg  
 5761 tcgcgtaaat aatccattcc atactattta tacagtaacc atacagatta taacagactt  
 5821 ccaaactgcc agaaaatata ctataatcga ttaagactat aatagatttg tgctaagttt  
 5881 cgtacctatg ttttaaggaa acagtcctta ttagtggtt catgtttgcc ggtacatctt  
 5941 gacttagctc actcgactta atcaaacctg cctttgatgt tagccactga ggtaatttgc  
 6001 attacaacat gtgttatctt cctctctgt cgcgcaaaca acactgcgtc aataacatct  
 6061 cggacgttgc tttgtttatt attctagaac attacttact tgagcatctt aattgcatta  
 6121 ttgttttaatt gttacctaag gactattttg gtaccactgc ccatagaaca ctttctatag  
 6181 gcagttatgc aaatttagat tttaaaacgt tgccttaaga gtctttattg ctgttaccta  
 6241 aaagagacta aactaaagca tgctacaaaa tatgtgtata gacgcgtgtc gtttggttatc  
 6301 ggtaaacatg tttccaccga aagtcattga aataagccat aagccatgcc acaataact  
 6361 gtaacgtaga atctggttta agatcgtagg agctctctta gtatggcgct acgaccctat 6385  
 6421 acttgtaatt aaacgtattt taattgtaatt ttagttgata ggcccaaagt taccatagcg  
 6481 ttttaaaaaat tgtacaatta ttaattttga acctgttcaa gttgacgttg gctaaaaata  
 6541 tagtttataaa aatgttgatt ctactagaca attttttaca tagtcctaaa atatatgcct  
 6601 tgactcgtca taattttaac tttattttat aagtagtaaa gcttcttagt ttataatttg  
 6661 taattagtaa aaaataatca ttcattttatt tctgccgact aggtatatatt ttagaattta  
 6721 gattttttata tttaatgata aataatgtaa ttattataat acaattgtca caaatttcaa  
 6781 tctcaatttg tataaagtc caaaatttat atgtttttat atgacaggta tgttataact  
 6841 ataaaaatag tgatatgata ctataggacg atatacgcaa tactagcgct gtcgagtcg  
 6901 ccatagagaa attgtttcaa gtcaaagatg taatgttacc atgttccacc accctgtata  
 6961 taaagttagc tagattgttg aattgttgat aaaataaaga gaatatgtc aataataaaa  
 7021 ttctaatttg attttaattg atgaatgcct cgatgttact ttggcctgaa gtttggtcaa

```

7081 ttaaaacgta ctcagaaata agttattagg aaacaaattg tataattaaa caaaaaatat
7141 tataatttct gttttataat tagggaaact tcttgacatc tgatttgata aaatatTTTT
7201 gcatttccac taatgacata taatcaaaaat tttctaatta ttgtatttat gtaatatcga
7261 tctatattgc ggttttctag tttgttttag tgggaatctt tttaattaag aatatatttt
7321 tgtatgaaat gttcttatgt gcaattaata tttgtaataa aaaggaagtc tgtgtcaacg
7381 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 7430

```

## pBluescript SK/sfur 93-6385 (Klon 5) - Ausschnitte aus der Basensequenz

- Basensequenz 5'→3' : Übergang von Vektor und SFurin Sequenz

```

pBluescript 737 sFur 93
NotI | |
TGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCCGCCAGTGTGCTCTAAAGAACGCTTTATCCCTACGTCTTACTGGTGAAAATA
TAAAAGTGATATTTCTTACGTTTAAATGAACAATGTCAGATGTCAAGAGGTGAATAGTCTGTGTTTGTGTTCTAA
CGTGTGAGTGACAGTTTTTATATTGTTTGGGATTTGGAGCGATAAACATATCGGTATAACGAGGTGGGATGACAC
AGTGTTCGACTAGGTCAACACTGAAGACGTTTCGGGAAATATTAGTAGGTGTGTTTGATAAAAAGTGCGTGAGGTT
CCTTATGACAAGGACTGAGTAGTTGGAACGCGCGGTTGTTATTGTGTCGGTGGGTGTCAGATGCGGTTGTGATTG
TGTAGTGTAGTGGTTACTGTCTATGGTGACATCATGGCGCGCGCTGGCGCTGCTGGCGGCGCTGCACGCGTGCGCC
GCGCTCCCGGAGCCGGTGTAATG

```

- Basensequenz 3'→5' : Übergang von Vektor und SFurin Sequenz

```

pBluescript 720 sfur 6385
EcoRV | |
GACGGTATCGATAAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGATCTTAAACCAGATTCTACGTTACAGTATAT
TGTGGCATGGCTTATGGCTTATTTCAATGACTTTCGGTGGAACATGTTTACCGATAACCAACGACACGCGTCTA
TACACATATTTTGTAGCATGCTTTAGTTTAGTCTCTTTTAGGTAACAGCAATAAAGACTCTTAAGGCAACGTTT
AAAATCTAAATTTGCATAACTGCCTATAGAAAGTATTCTATGGGCAGTGGTACCAAAAATAGTCCTTAGGTAACAA
TTAAACAATAATGCAATTAAGATGCTCAAGTAAGTAATGTTCTAGAATAATAACAAAGCAACGTCCGAGATGTT
ATTGACGCAGTGTGTTTTCGCGACAGAGAGGGAAGATAACACATGTTGTAATGCAAATTACCTCAGTGGCTAAC
ATCAAAGGCAGGTTTGATTAA

```

## Übersicht: Anreicherung der SFurin-Aktivität

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Fällung	FPLC-Säule [Fraktion]	Volumen [ml]	Konzentration [µg/ml]	Total Protein [µg]	Aktivität [EU]	Spez. Aktivität [EU/µg]	Anreicherung [n-fach]
<b>45%</b>	<b>resuspendiert</b>	<b>127,0</b>	<b>280</b>	<b>36800</b>	<b>1110</b>	<b>0,03</b>	<b>[1]</b>
	<b>Ansatz geteilt</b>	<b>63,5</b>	<b>280</b>	<b>17780</b>	<b>1110</b>	<b>0,06</b>	<b>1</b>
	<b>Mono Q</b>						
<i>2x</i>	<b>5</b>	1,5	290	440	1100	2,5	<b>40</b>
	<b>6</b>	1,5	620	930	2650	2,8	<b>45</b>
	<b>7</b>	1,5	550	820	2540	3,1	<b>50</b>
	<b>8</b>	1,5	560	840	2520	3,0	<b>50</b>
	<b>9</b>	1,5	460	690	1540	2,2	<b>40</b>
	<b>10</b>	1,5	580	870	990	1,1	<b>20</b>
	<b>11</b>	1,5	520	780	560	0,7	<b>10</b>
	<b>12</b>	1,5	420	630	350	0,5	<b>10</b>
	<b>ges. 5-12</b>	<b>12,0</b>	<b>500</b>	<b>6000</b>			
<b>55%</b>	<b>resuspendiert</b>	<b>30,0</b>	<b>330</b>	<b>9900</b>	<b>960</b>	<b>0,1</b>	<b>1</b>
	<b>Mono Q</b>						
	<b>5</b>	1,5	580	870	1380	1,6	<b>15</b>
	<b>6</b>	1,5	1080	1620	1630	1,0	<b>10</b>
	<b>7</b>	1,5	800	1200	2230	1,9	<b>20</b>
	<b>8</b>	1,5	970	1460	2160	1,5	<b>15</b>
	<b>9</b>	1,5	940	1410	1590	1,1	<b>10</b>
	<b>10</b>	1,5	1100	1650	1290	0,8	<b>10</b>
	<b>11</b>	1,5	800	1200	1370	1,1	<b>10</b>
	<b>12</b>	1,5	340	510	610	1,2	<b>10</b>
	<b>ges. 5-12</b>	<b>12,0</b>	<b>825</b>	<b>9920</b>			
	<b>14</b>	1,5	80	120	90	0,8	<b>10</b>
	<b>15</b>	1,5	40	60	40	0,7	<b>5</b>
	<b>16</b>	1,5	30	50	20	0,4	<b>5</b>
<b>75%</b>	<b>resuspendiert</b>	<b>75,0</b>	<b>350</b>	<b>26300</b>	<b>1700</b>	<b>0,06</b>	<b>1</b>
	<b>Mono Q</b>						
	<b>5</b>	1,5	1120	1680	1890	1,1	<b>20</b>
	<b>6</b>	1,5	1240	1860	2340	1,3	<b>20</b>
	<b>7</b>	1,5	1080	1620	2290	1,4	<b>25</b>
	<b>8</b>	1,5	1200	1800	2490	1,4	<b>25</b>
	<b>9</b>	1,5	1100	1650	1940	1,2	<b>20</b>
	<b>10</b>	1,5	1480	2220	1630	0,7	<b>10</b>
	<b>11</b>	1,5	980	1470	490	0,3	<b>5</b>
	<b>12</b>	1,5	450	680	240	0,4	<b>5</b>
	<b>ges. 5-12</b>	<b>12,0</b>	<b>1080</b>	<b>12980</b>			
<b>45%</b>	<b>7<sup>2</sup> nach MonoQ</b>	1,5	550	830	2540	3,1	<b>50</b>
	<b>Superdex-75</b>						
	<b>6</b>	3,0	40	120	280	2,3	<b>40</b>
	<b>7</b>	3,0	60	180	10	0,1	<b>1</b>
	<b>8</b>	3,0	60	180	30	0,2	<b>5</b>
	<b>9</b>	3,0	40	120	250	2,1	<b>35</b>
	<b>10</b>	3,0	25	75	2170	28,9	<b>480</b>
	<b>11</b>	3,0	30	90	2800	31,1	<b>520</b>
	<b>12</b>	3,0	30	90	1380	15,3	<b>255</b>
	<b>13</b>	3,0	30	90	260	2,9	<b>50</b>
	<b>14</b>	3,0	20	60	80	1,3	<b>20</b>
	<b>15</b>	3,0	10	30	270	9,0	<b>150</b>
	<b>16</b>	3,0	10	30	90	3,0	<b>50</b>

## **Präsentation von Arbeitsergebnissen auf Tagungen**

### **Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie**

09. – 12. März 1999 in Bremen

Poster: Strukturanalyse der zytoplasmatischen Domäne des HCMV Glykoproteins B (gB).

**Scheffczik, H., Eickmann, M. und Garten W.**

### **ÄKTA™ User Club 2000 (*Amersham Pharmacia Biotech*)**

23. – 25. Oktober 2000 in Schluchsee

Vortrag: Reinigung eines rekombinant exprimierten viralen Matrixproteins.

**Scheffczik, H., Kraus, I., Kiermayer, S., Eickmann, M. und Garten W.**

### **Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie**

14. – 17. März 2001 in Dresden

Vortrag: Structure-function relationship of the DNA binding protein pUL56 of human Cytomegalovirus.

**Bogner, E., Scheffczik, H., Savva Christos G. W., and Holzenburg, A.**

### **Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie**

14. – 17. März 2001 in Dresden

Poster: Reifung und Transport des BDV-Glykoproteins.

**Kiermayer, S., Eickmann, M., Kraus, I., Scheffczik, H., Fließ, M., Richt, J. und Garten, W.**

### **Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie**

14. – 17. März 2001 in Dresden

Poster: Das Matrixprotein des Bornavirus.

**Kraus, I., Eickmann, M., Scheffczik, H., Bogner, E., Kiermayer, S., Fließ, M., Richt, J. und Garten, W.**

## Veröffentlichungen

**Scheffczik, H., Kraus, I., Kiermayer, S., Bogner, E., Holzenburg, A., Garten, W., and Eickmann, M.** (2001). Multimerization potential of the cytoplasmic domain of the human cytomegalovirus glycoprotein B. *FEBS Lett.* **506**, 113-116.

**Scheffczik, H., Savva, C. G. W., Holzenburg, A., Kolesnikova, L., and Bogner, E.** (2002). The terminase subunits pUL56 and pUL89 of human cytomegalovirus are DNA metabolizing proteins with toroidal structure. *Zur Publikation eingereicht bei Nucleic Acids Research.*

**Kraus, I., Eickmann, M., Kiermayer, S., Scheffczik, H., Fluess, M., Richt, J. A., and Garten, W.** (2001). Open reading frame III of borna disease virus encodes a nonglycosylated matrix protein. *J. Virol.* **75**, 12098-12104.

**Kraus, I., Scheffczik, H., Bogner, E., Eickmann, M., Kiermayer, S., Stubbs, M. T., and Garten, W.** (2002). Single particle analysis and crystallisation of the matrix protein of borna disease virus. *Zur Publikation eingereicht bei FEBS Letters.*

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. W. Garten danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, seine stete Diskussionsbereitschaft und freundliche Unterstützung während der vorliegenden Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. Kindl möchte ich für die Betreuung und Vertretung gegenüber dem Fachbereich Chemie und für sein Interesse an dieser Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. H.-D. Klenk danke ich für die sehr guten Arbeitsbedingungen am Institut.

Als Wissenschaftler und Freund möchte ich Herrn Dr. Markus Eickmann herzlich danken für seine Fachkompetenz, die sehr gute theoretische und praktische Betreuung während dieser Arbeit und seine stete Bereitschaft, Probleme jeglicher Art anzupacken.

Bei Frau Dipl.-biol. Martina Weik bedanke ich mich für ihre Geduld und ihren Einsatz bei der Durchführung zahlreicher Experimente, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und die als guter Geist das angenehme Arbeitsklima im Labor aufrechterhalten hat.

Bei Simone Kiermayer, Ina Kraus, Amir Reza Vahhabzadeh und Carsten Schöneberg sowie den ehemaligen Laborkolleginnen Susanne Berghöfer und Hanna Khan möchte ich mich für das nette und kooperative Arbeitsklima im Labor bedanken.

Frau Dr. Elke Bogner danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der Bearbeitung eines außerhalb dieser Arbeit entstandenen Forschungsprojekts.

Herrn Dr. Ralf Ficner möchte ich herzlich danken für seine freundliche Unterstützung und die zahlreichen kompetenten Ratschläge zur Proteinexpression, Reinigung und Kristallisation, nicht zuletzt für die Hilfe bei der Kristallisation der SFurin Prodomäne am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen.

Den Arbeitsgruppen von Dr. Viktor Volchkov, Herrn Prof. Dr. K. Radsak und Frau Dr. Elke Mühlberger, insbesondere Yannik Boehmann für seine Hilfe bei Interaktionsstudien am Biacore-Gerät, möchte ich meinen Dank aussprechen.

Mein Dank gilt all den Mitarbeitern des Instituts für Virologie in Marburg, die mir bei meiner Arbeit geholfen haben und die maßgeblich zu der sehr angenehmen Atmosphäre des Hauses beigetragen haben.

Bei meinen Eltern möchte ich mich für ihre große Unterstützung und ihr Vertrauen in mich ganz lieb bedanken.

Meinen Großeltern möchte ich danken für ihre stete Unterstützung während meines gesamten Werdegangs der letzten drei Jahrzehnte.

Und ein ganz besonders großes Dankeschön an meine Frau Carolin.



## Erklärung

Ich versichere, daß ich meine Dissertation mit dem Titel „Hemmstudien von rekombinant exprimiertem und gereinigtem *Spodoptera frugiperda* Furin (SFurin) mittels Peptidinhibitoren – Struktur- und Inhibitionseigenschaften der SFurin-Prodomäne“ selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, im Januar 2002

.....  
(Hanno Scheffczik)